

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

**Resposta de genótipos de citros à leprose e variabilidade genética  
da ORF *p29* do vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)**

**Juliana Aparecida Pereira**

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

**Piracicaba  
2012**

Juliana Aparecida Pereira  
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

**Resposta de genótipos de citros à leprose e variabilidade genética da ORF *p29*  
do vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Profa. Dra. **JULIANA DE FREITAS ASTÚA**

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

**Piracicaba  
2012**

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

Pereira, Juliana Aparecida

Resposta de genótipos de citros à leprose e variabilidade genética da ORF p29 do vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) / Juliana Aparecida Pereira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Ácaros 2. Citricultura 3. Leprose 4. Mutação genética 5. Variação genética em plantas 6. Vetores de doenças de plantas 7. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.3  
P436r

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

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, irmãos, namorado e amigos.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela dedicação;

Aos meus irmãos, namorado e sua família pelo apoio;

Aos meus sobrinhos Íris e João, por entenderem que não pude ser uma tia tão presente;

À Dri, Kadu e Júlio por ser meu porto seguro e mostrar que família não se restringe a laços consanguíneos;

Aos amigos Chris, Thais, Jiló, Bi, Renatão, Chris P., Lele, César, Ivens e Helen pela companhia e programas de última hora que sempre me fazem lembrar a faculdade;

À Malu por sempre, mesmo estudando para o vestibular de medicina, me escutar pacientemente;

À Nina, em especial, por sempre me esperar em casa, independente do que aconteça;

Aos amigos Claudinho, Bob, Julião, João Vítor, Rafa, Thiago, Milena e Ismi por sempre dar aquela descontraída, quando mais precisei;

Aos amigos de longe, Fer Nicoloni, Frank Magno, Naiara Segatti, Fer Japa, Lari, Paty e minha querida Angélica, que mesmo longe continuam próximos;

À Emiliana e Wellington por sempre estarem dispostos a me ajudarem;

Ao Josh pela amizade e por entender que como suplente teve que participar mais das reuniões do que eu, devido a distância;

Aos amigos do IAC pela amizade e por deixar os dias mais leves;

Às Dras. Andréia e Valdenice pela amizade e auxílio sempre que precisei;

À Dra. Marinês pela co-orientação, embora não oficial;

À Dra. Michele pelo auxílio com as muitas sequências e desenho dos vários primers, afinal bioinformática nunca foi meu forte;

À Dra. Juliana Freitas-Astúa pela orientação;

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola da Esalq/USP;

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.



## ΕΠÍΓΡΑΦΕ

"I've learned how to think like a virus; no neurons, a lot of sex, and a lot of errors".

John J. Holland



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3 OBJETIVOS .....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Material vegetal, ácaros e isolados do vírus.....	31
4.2 Resposta de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros à leprose.....	33
4.3 Sequenciamento e análise da variabilidade da <i>p29</i> do CiLV-C.....	34
4.3.1 Variabilidade do vírus em diferentes hospedeiros .....	34
4.3.2 Sequenciamento e estudo de variabilidade das amostras de diferentes regiões geográficas .....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Material vegetal, ácaros e isolados do vírus.....	37
5.2 Resposta de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros à leprose.....	40
5.3 Sequenciamento e análise da variabilidade da <i>p29</i> do CiLV-C.....	45
5.3.1 Variabilidade do vírus em diferentes hospedeiros .....	45
5.3.2 Sequenciamento e estudo de variabilidade das amostras de diferentes regiões geográficas .....	54
6 CONCLUSÕES .....	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS .....	73



## RESUMO

### Resposta de genótipos de citros à leprose e variabilidade genética da ORF *p29* do vírus da leprose dos citros C (CiLV-C)

Os vírus possuem potencial de variabilidade genética muito alto, isso porque necessitam divergir seu material genético suficientemente para se adaptar às inúmeras mudanças às quais são submetidos. Portanto, a variabilidade genética é essencial para a sobrevivência desses organismos; é o primeiro passo para a adaptação em um novo hospedeiro, quebra de resistência, alterações nos sintomas e virulência, o que justifica o interesse em estudos nessa área. Os estudos de variabilidade consistem numa excelente ferramenta para a compreensão da evolução dos vírus e busca pelo manejo adequado de doenças virais. Por isso objetivou-se estudar a variabilidade genética da ORF *p29* do CiLV-C, a fim de gerar informações relevantes acerca do patossistema e da preponderância de isolados, com possíveis implicações na epidemiologia da doença e seu manejo no campo, além de uma melhor compreensão sobre a evolução desse vírus, que até então nunca havia sido explorada. Neste trabalho foram avaliadas plantas de citros e outras hospedeiras potenciais do CiLV-C. Os resultados sugerem que as plantas de tangerina Cravo, Tardia da Sicília, Cleópatra, Vermelha, tangor Ortanique, laranja Azeda e trapoeraba são suscetíveis à doença e também podem servir como fontes de inóculo do vírus para citros. Já as plantas de limão Siciliano e Cravo, e limas ácidas Tahiti e Galego e *Mimosa caesalpiniaefolia* mostraram-se resistentes à doença, mas não à colonização do ácaro vetor. As plantas de *Malvaviscus arboreus* e *Solanum violaeifolium* não apresentaram sintomas, mas mostraram-se possíveis fontes de inóculo do vírus para plantas de citros. Além disso, foram avaliadas as respostas de 62 genótipos de tangerinas e seus híbridos à doença, sendo que 15 mostraram-se resistentes e podem, posteriormente, ser utilizados em programas de melhoramento genético, que é uma das alternativas para reduzir o uso de pesticidas para o controle do vetor. Foi identificada baixa variabilidade genética entre os isolados do CiLV-C, independentemente do hospedeiro ou localidade, entretanto, o isolado de São José do Rio Preto pareceu ser o mais divergente e capaz de passar suas alterações durante sua transmissão a outros hospedeiros. Mais estudos devem ser feitos para que conclusões inquestionáveis sejam tiradas desse assunto, mas os resultados obtidos abriram um novo leque de possibilidades para futuros estudos nessa área até então pouco explorada.

Palavras-chave: Adaptação; Mutação; CiLV-C; *Brevipalpus phoenicis*



## ABSTRACT

### Response of citrus genotypes to leprosis and genetic variability of ORF *p29* from *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C)

Viruses have, potentially, broad genetic variability because of their need to adapt to several changes that they are exposed to. Therefore, genetic variability is essential for their survival; it is the first step to adapt to a new host, to break resistance down, to change symptoms and virulence, which justifies the interest in studies in this area. These studies consist in a great tool for a better understanding on the virus evolution and the search for a proper management of viral diseases. Hence, it was aimed to study the genetic variability of ORF *p29* from CiLV-C in order to generate relevant information about the pathosystem and the predominance of isolates with possible implications on the epidemiology of the disease and its management in the field, besides a better understanding on the evolution of this virus, which has never been explored before. In this work, we evaluated citrus plants and potential hosts for CiLV-C. The results suggest that the plants of Cravo, Tardia da Sicília, Cleopatra, and Vermelha mandarin, Ortanique tangor, Sour orange and spiderwort are susceptible to the disease and can also serve as sources of inoculum of the virus to citrus. Siciliano lemon, Rangpur, Tahiti, and Mexican limes, and *Mimosa caesalpiniaefolia* were resistant to the disease, but not to the colonization of the mite vector. *Malvaviscus arboreus* and *Solanum violaefolium* plants did not present symptoms, but can be considered possible sources of CiLV-C inoculum to citrus plants. In addition, we evaluated the response of 62 mandarin genotypes and their hybrids to the disease. Fifteen of them were considered resistant and could be used in breeding programs with the objective to reduce the use of pesticides to control the vector. Low genetic variability was found amongst CiLV-C isolates, regardless of the host or geographic region; however, the São José do Rio Preto isolate was the most divergent and the changes in nucleotides were transmitted to the other hosts. Further studies should be conducted before unquestionable conclusions can be drawn from this issue, but the results obtained here have opened a new range of possibilities for future studies in this area so far almost unexplored.

Keywords: Adaptation; Mutation; CiLV-C; *Brevipalpus phoenicis*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição das amostras de diferentes regiões geográficas.....	35
Figura 2 -	<i>A-Brevipalpus phoenicis</i> fixado em lâmina. B-destaque nos dois solenídeos no tarso II. C-destaque para as cinco setas dorso-laterais (fotos: Dra. Maria Andréia Nunes, Centro APTA Citros Sylvio Moreira.).....	37
Figura 3 -	Sintomas de leprose em laranja Azeda após infestação com ácaros virulíferos.....	39
Figura 4 -	Sintomas de leprose em folhas de arabidopsis, após infestação com ácaros (foto: Gabriella Dias Arena, Centro APTA Citros Sylvio Moreira).....	39
Figura 5 -	Sintomas de CiLV-C em folhas de trapoeraba, após infestação com ácaros.....	40
Figura 6 -	Cladograma construído utilizando o algoritmo Neighbor Joining com valores de bootstrap calculados com 1000 replicatas a partir do alinhamento das sequências da <i>p29</i> do CiLV-C dos diferentes hospedeiros, das respectivas Pera, das sequências depositadas no GenBank (Locali=DQ352194.1; Pascon=DQ157466.1; Guerra=DQ388512.1) e do Hibiscus green spot vírus, um vírus também transmitido por <i>B. phoenicis</i> .....	51
Figura 7 -	Matriz de distância calculada entre as sequências consenso da <i>p29</i> do CiLV-C dos diferentes hospedeiros, respectivas laranjas Pera, e sequências depositadas no GenBank. Os valores de cor vermelha representam aqueles mais próximos, os de cor azul, os mais distantes e valores de cor amarela, os medianos.....	52
Figura 8 -	Cladograma contruído utilizando o algoritmo Neighbor Joining, com valores de bootstrap com 1000 replicatas, a partir do alinhamento das sequências da <i>p29</i> das diferentes regiões geográficas e sequências depositadas no GenBank (Locali=DQ352194.1;Pascon=DQ157466.1;Guerra=DQ388512.1)	57
Figura 9 -	Matriz de distância, com valores em porcentagem calculados	

entre as sequências da *p29* das diferentes regiões geográficas e sequências depositadas no GenBank. Os valores de cor vermelha representam aqueles mais próximos, os de cor azul, os mais distantes e valores de cor amarela, os medianos..... 58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação das plantas-teste desafiadas com o vírus da leprose dos citros C através de infestação com ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos.....	32
Tabela 2 -	Relação de plantas, aparecimento de sintomas e resultado de RT-PCR para a detecção do CiLV-C.....	38
Tabela 3 -	Relação de acessos de tangerinas e híbridos do BAG Citros IAC estudados e resposta à leprose dos citros em casa de vegetação. Em destaque, plantas assintomáticas.....	43
Tabela 4 -	Relação dos primers desenhados para a amplificação da ORF <i>p29</i> do CiLV-C.....	46
Tabela 5 -	Variação de códon e aminoácidos da sequência da <i>p29</i> do vírus da leprose do citros C (CiLV-C) entre as amostras analisadas em comparação ao consenso das três sequências depositadas no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1 e DQ388512.1)....	48
Tabela 6 -	Relação do número de sequências agrupadas nos contigs gerados pelas amostras das diferentes localidades.....	54



## 1 INTRODUÇÃO

Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus não deixaram fósseis, o que dificulta compreender a evolução dos mesmos. Muitos acreditam que eles evoluíram de elementos celulares e que desenvolveram a habilidade de se auto replicarem e se auto agregarem. A verdade é que os vírus que conhecemos hoje mudaram tanto que já não se parecem mais com seu ancestral, seja ele qual for, e, a cada dia que passa, a emergência de novos vírus vem sendo mais comum. A taxa de variabilidade genética entre os vírus é muito alta, principalmente entre aqueles que possuem RNA como material genético, o que justifica o interesse em estudos de variabilidade envolvendo esses vírus. Dentro de uma mesma população pode haver uma variação muito grande entre os indivíduos. Isso porque os vírus devem divergir suficientemente para se adaptar às mudanças no meio ambiente, sem perder sua virulência durante a passagem de um hospedeiro para outro. Por isso, levando-se em conta que até pouco tempo atrás o vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) era considerado restrito a citros e atualmente sua gama de hospedeiras tem aumentado significativamente, e que ele tem sido relatado em novas áreas até então indenes, buscou-se estudar a variabilidade genética da ORF *p29*, possível capa protéica do vírus, em seus diferentes hospedeiros para tentar identificar alterações que pudessem estar relacionadas a esse fenômeno. Os estudos com variabilidade genética de vírus são ferramentas importantes para mitigar os mistérios da origem dos mesmos, tomar conhecimento de vírus emergentes, além de fornecer informações relevantes para a compreensão de sua epidemiologia, que podem ser usadas na criação de novas técnicas para diagnóstico e novas estratégias de controle das doenças por eles causadas. O vírus da leprose dos citros C pode ser um potencial vírus emergente, já que possui crescente gama de hospedeiras e disseminação geográfica. Além disso, a doença se destaca por ser considerada a principal doença viral da cultura do citros e causar perdas anuais em torno de US\$ 80 milhões, devido a gastos com o controle químico de seu vetor, o ácaro *Brevipalpus phoenicis*. A cultura mais afetada pela doença é uma das mais importantes commodities do país, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo. Uma das variedades de citros mais suscetíveis à doença é a laranja Pera, que é a mais cultivada no País. O vetor da doença é polífago e cosmopolita, o que facilita a disseminação do vírus entre seus hospedeiros com

sucesso. Além de ser eficiente na transmissão do CiLV-C, este ácaro é conhecido por ser vetor de vírus causadores de várias doenças a culturas distintas, como a mancha anular do cafeeiro, a pinta verde do maracujazeiro, a mancha da orquídea, entre outros (causados, respectivamente, por Coffee ringspot virus, Passion fruit green spot virus e Orchid fleck virus). Portanto, qualquer esforço que leve a uma melhor compreensão desse patossistema pode trazer benefícios para futuros estudos envolvendo o vírus da leprose ou aqueles outros vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A variabilidade genética é essencial para a sobrevivência dos organismos e é comum entre os vírus. Um determinado isolado pode possuir um enorme potencial de variabilidade, contendo uma população de variantes em torno de uma sequência consenso (HOLLAND et al., 1982). Devido à sua ampla população, tempo reduzido de geração e replicação rápida do genoma instável de RNA (DRAKE; HOLLAND, 1999), os vírus em geral, mas principalmente os que possuem RNA como material genético, têm grande potencial de evolução e de adaptação a diversas situações impostas pela seleção natural, sendo que as fontes de variabilidade mais comuns são a recombinação e a mutação (GARCIA-ARENAL et al., 2003). A recombinação permite aos vírus de plantas permutarem seus genes e garantirem uma eficiente transmissão pelo vetor ou propagação célula a célula. Além da recombinação, a baixa fidelidade das RNA polimerases, sem mecanismos de correção de erros, é responsável pelas altas taxas de variabilidade nesses vírus (STRAUSS; STRAUSS, 1988). A alta incidência de mutação, recombinação e rearranjo dos genomas virais aumenta a geração de novos variantes que, quando a mutação resulta em vantagem biológica, rapidamente se dispersam pela população viral (MOYA et al., 2004). Embora haja alto potencial de variabilidade entre os vírus, isso não significa, necessariamente, que haja de fato uma grande diversidade em sua população; afinal, fatores como a seleção natural e o efeito gargalo podem reduzir a variabilidade genética, selecionando os isolados e tornando a população mais homogênea (GARCÍA-ARENAL et al., 2001).

Os vírus que recentemente mudaram, sendo bem sucedidos na seleção natural e no efeito gargalo, ou surgiram para ocupar e se espalhar dentro de um novo nicho são conhecidos como vírus emergentes (ROJAS; GILBERTSON, 2008). Um vírus emergente é, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aquele que aparece na população pela primeira vez, ou pode já existir, mas é capaz de aumentar rapidamente sua incidência ou extensão geográfica. Eles são conhecidos pelo aumento da sua incidência em um determinado nicho, devido a mudanças no meio ambiente, vetor, hospedeiro ou no genoma viral (HANSSEN et al., 2010). As doenças virais emergentes podem ser causadas pelo surgimento de uma nova espécie viral, por uma espécie viral de uma determinada cultura que está emergindo em outra totalmente distinta, ou vírus antigos que reemergem devido ao uso de

cultivares antigos (HANSSEN et al., 2010). A emergência de novos vírus é frequentemente reportada (PADIDAM et al., 1999; DUFFY et al., 2009; HANSSEN et al., 2010; ZHANG; ZHANG et al., 2011; MELZER et al., 2012; WYLIE; JONES, 2011b), provavelmente devido a constantes mudanças climáticas, práticas culturais, hospedeiros, vetores, além, é claro, da mudança do genoma viral. Os vírus que têm RNA como material genético possuem alto potencial evolucionário e são os mais representativos dentro dos vírus emergentes. São eles os vírus que possuem maiores taxas de substituições, quando comparados com os de DNA e, por isso, são ferramentas fundamentais para estudos de variabilidade e evolução (DUFFY et al., 2008). No entanto, há relatos de que alguns vírus de RNA evoluam mais devagar e com menor taxa de mutação, não que eles tenham desenvolvido um mecanismo de correção de erros durante sua replicação, mas deve-se ao seu extenso período de latência, ou seja, estes vírus passam muito tempo dentro do mesmo hospedeiro, sem haver necessidade de se adaptar a um novo. É o que ocorre, por exemplo, para o *Simian foamy virus* (SFV) (SWITZER et al., 2005).

A variabilidade genética é o primeiro passo para a adaptação em um novo hospedeiro, quebra de resistência, mudanças nos sintomas e virulência. Para expandir a gama de hospedeiros, a população viral deve ter um ou mais variantes, muitas vezes com incidência muito baixa, capaz de infectar o hospedeiro potencial. No novo hospedeiro, aqueles variantes se adaptarão facilmente e aumentarão sua frequência (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Aproximadamente 70% das mutações são deletérias e muitas vezes letais (SANJUÁN et al., 2004; CARRASCO et al., 2007; DOMINGO-CALAP et al., 2009). As mutações deletérias podem resultar em falhas na replicação ou em desvantagem seletiva (STRAUSS; STRAUSS, 1988). Consequentemente, nem todos os variantes que são produzidos são mantidos na população viral. Entretanto, algumas dessas mudanças, que são deletérias no hospedeiro atual, podem ser adaptativas sob diferentes condições (DUFFY et al., 2006; FERRIS et al., 2007), como em outros hospedeiros. A taxa de variabilidade genética depende da espécie de hospedeiro infectada, embora os mecanismos responsáveis por essa taxa de variação sejam desconhecidos (PITA et al., 2007). No trabalho de Acosta-Leal et al. (2010) foi possível detectar maior variabilidade genética na população do *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) que infectava cultivares de beterraba parcialmente resistentes do que suscetíveis. A alta taxa de

variabilidade genética pode estar associada também ao centro de origem do vírus, onde este iniciou sua adaptação a um novo hospedeiro, gerando assim seus variantes mais adaptados que se estabeleceram (FARGETTE et al., 2004; TOMIMURA et al., 2004; OHSHIMA et al., 2010).

O vírus da leprose dos citros C (*Citrus leprosis virus C*, CiLV-C) pode ser um potencial vírus emergente, afinal trata-se de um vírus de RNA, com novos relatos em diferentes regiões geográficas e crescente gama de hospedeiras. A leprose foi relatada pela primeira vez na Flórida em 1911, por Fawcett (BASTIANEL et al., 2010), sendo que desde a década de 1960 a doença não se encontra mais nos Estados Unidos. No entanto, estudos recentes sugerem que a doença observada no início do século 20 na América do Norte era causada por outro vírus, o *Citrus leprosis virus*, nuclear type (CiLV-N), menos agressivo e menos prevalente que o CiLV-C (KITAJIMA et al., 2011). Os demais relatos de leprose no mundo referem-se à doença causada pelo CiLV-C, e é esse o patógeno que vem sendo disseminado a novas áreas geográficas. A partir da década de 1920, a leprose foi relatada na América do Sul (SPEGAZZINI, 1920; BITTANCOURT, 1955; VERGANI, 1945), tendo ficado restrita a Paraguai, Argentina e Brasil por cerca de 80 anos (BASTIANEL et al., 2010). Há pouco mais de uma década, a doença começou a ser encontrada nos países mais ao norte do continente Americano, tendo sido relatada na Venezuela em 1999 (RANGEL et al., 2000), no Panamá em 2000 (DOMINGUEZ et al., 2001), e em outros países da América do Sul, como Bolívia e Colômbia a partir da metade da década (GÓMEZ et al., 2005; LEÓN et al., 2006). Atualmente, há relatos de leprose em todos os países da América Central (incluindo Belize, até pouco tempo indene) e em ao menos dois estados do México, na América do Norte (BASTIANEL et al., 2010; IZQUIERDO et al., 2011).

Praticamente todas as novas constatações de leprose estão associados à presença do ácaro *Brevipalpus phoenicis*, apesar dos relatos de transmissão pelas espécies *B. californicus* e *B. obovatus* (BASTIANEL et al., 2010). No entanto, OCHOA et al. (2011) sugerem que, possivelmente, o que é considerado *B. phoenicis* poderia ser dividido em duas espécies. Exames de cerca de 200 espécimes do ácaro, coletados em diferentes pontos do Estado de São Paulo, em citros e cafeeiros, mostraram diferenças morfológicas significativas no dorso, na espermateca e na seta do fêmur do palpo nas fêmeas entre eles. Os autores têm

dividido os dois grupos predominantes em “tipo citros” e “tipo café” em função da prevalência de cada grupo nos respectivos hospedeiros (OCHOA et al., 2011). Ainda não se sabe se há alguma implicação dessas diferenças entre populações na capacidade vetora dos ácaros; no entanto, Arrivabben et al. (2005, 2007) mostraram que há diferença na transmissão do CiLV-C por diferentes populações de *B. phoenicis*, sendo que uma população proveniente de café testada praticamente não era capaz de transmitir o vírus. Assim, não se pode eliminar a possibilidade de que espécies (ou “tipos”) de *Brevipalpus* com capacidade vetora diferencial possam estar envolvidas nos novos relatos da doença em direção ao norte do continente americano. Para outros patossistemas, situação semelhante foi confirmada. Existem diferentes taxas de transmissão de vírus entre biótipos de *Bemisia tabaci*, o que enfatiza a importância da identificação do vetor (VALVERDE et al., 2004). Polston; Anderson (1997) mostraram, em artigo de revisão, que a introdução do biótipo B de *B. tabaci* ao continente americano foi responsável pela disseminação e emergência de begomovírus à região.

Se a disseminação da leprose para novas áreas está relacionada à presença ou dispersão de um vetor mais eficiente ainda não se sabe, mas certamente merece ser investigada. Ademais, nos últimos anos aumentaram não apenas os relatos de leprose em novas regiões geográficas, mas também em novos hospedeiros. Até poucos anos atrás, a leprose era considerada exclusiva dos citros (FEICHTENBERGER et al., 1997; RODRIGUES et al., 2003), mas hoje sabe-se que a gama de hospedeiras desse vírus é significativamente maior do que inicialmente relatada. O primeiro trabalho a mostrar que o CiLV-C possuía outros hospedeiros além do citros foi publicado por Colariccio et al. (1995). Os autores relataram a transmissão mecânica, ainda que com dificuldade, do CiLV-C de citros para *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Gomphrena globosa*, conhecidas espécies indicadoras de vírus. Rodrigues et al. (2005) foram os primeiros a relatar a transmissão experimental do CiLV-C por ácaros para plantas fora do gênero *Citrus*. Os experimentos mostraram que os ácaros eram capazes de transmitir o vírus de citros para falsa hera (*Solanum violaefolium*) e entre plantas de falsa hera, mas não desta hospedeira alternativa de volta para citros. Os perfis da eletroforese de dsRNA foram ligeiramente diferentes entre as plantas hospedeiras, mas a amplificação por RT-PCR resultou em fragmentos de tamanhos esperados (RODRIGUES et al.,

2005). Isso sugere perda ou alteração de algum componente viral quando em *S. violaefolium*, que pode ser essencial para a infecção em citros, ou ainda que os haplótipos predominantes em Solano não sejam os mais adequados para causar doença em citros. Há relatos também de transmissão de CiLV-C por ácaros para plantas de *Phaseolus vulgaris* (GROOT et al., 2006), *Glycosmis pentaphylla* (FREITAS-ASTÚA et al., 2009), *Arabidopsis thaliana* (KUBO et al., 2010), *Hibiscus* sp., *Malvaviscus arboreus*, *Grevillea robusta* e *Bixa orellana* (NUNES et al., 2012a). Em 2008, Leon et al. relataram infecção natural por CiLV-C em plantas fora do gênero *Citrus*, mas da mesma família rutácea: *Swinglea glutinosa*. Recentemente, trapoeraba (*Commelina benghalensis*), uma monocotiledônea da família Commelinaceae comumente encontrada em pomares de citros como planta invasora, foi relatada como hospedeira natural do CiLV-C no estado de São Paulo (NUNES et al., 2012b).

Há vários anos a leprose dos citros tem sido considerada a principal doença viral da cultura no Estado de São Paulo, pois causa perdas da ordem de US\$ 80 milhões/ano apenas nesse Estado devido a gastos com o controle químico de seu vetor (BASTIANEL et al., 2010). Dentro do gênero *Citrus*, a laranja doce é a espécie mais suscetível à leprose e a variedade 'Pera' é uma das mais importantes da citricultura paulista e também uma das mais afetadas pelo vírus (BITANCOURT, 1956; RODRIGUES et al., 2000a, BASTIANEL et al., 2010). Já os limões, limas ácidas e as tangerinas são considerados menos suscetíveis (BITANCOURT, 1955; CHIAVEGATO; MISCHAN, 1987), embora existam relatos de sintomas em algumas dessas variedades (DOMINGUES; RODRIGUES, 1999; BASTIANEL et al., 2008, 2010; FREITAS-ASTÚA et al., 2008), e plantas assintomáticas que possam apresentar baixas concentrações do vírus (BASTIANEL et al., 2004). Isso indica que estas espécies podem desempenhar papel relevante na epidemiologia da leprose como hospedeiros intermediários. Este comportamento diferenciado entre variedades cítricas à doença pode ser devido à resistência ao vetor ou ao vírus (BOARETTO, 1994). No entanto, poucos estudos foram realizados para avaliar essa resposta.

O tempo entre a inoculação do CiLV-C por ácaros virulíferos e o aparecimento dos sintomas no campo pode variar consideravelmente, podendo levar vários meses (BASSANEZI et al., 2002). Os sintomas são caracterizados pelo aparecimento de

lesões locais cloróticas e/ou necróticas em folhas, frutos e ramos, o que resulta na queda prematura de folhas e frutos, comprometendo a produção e reduzindo a vida útil da planta (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2006, 2010). A leprose pode ser causada por dois vírus distintos: um prevalente e que se acumula no citoplasma das células infectadas, o *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2008); e outro de ocorrência rara, que se acumula no núcleo das células infectadas, o *Citrus leprosis virus, nuclear type* (RODRIGUES et al., 2003). Devido a semelhanças morfológicas entre esses vírus e os rhabdovirus, e também ao acúmulo de partículas no citoplasma ou núcleo de células infectadas, eles foram inicialmente considerados membros tentativos da família *Rhabdoviridae* (KITAJIMA et al., 2000). No entanto, com o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C foram observadas diferenças significativas entre este e os rhabdovirus (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Por isso, foi proposto que o vírus da leprose deveria ser considerado a espécie-tipo de um novo gênero, *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2008), o que foi aprovado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) (CARSTENS et al., 2010; LOCALI-FABRIS et al., 2012). O sequenciamento do CiLV-C evidenciou seu genoma bipartido, com duas moléculas de ssRNA de sentido positivo com 8.745 e 4.986 nucleotídeos, respectivamente (LOCALI-FABRIS et al., 2006). No RNA 1 está a ORF de interesse deste estudo, a *p29*, que codifica uma proteína com possível função de nucleocapsídeo (LOCALI-FABRIS et al., 2006; CALEGARIO et al., 2008). O interesse nesse gene é justificado pelas inúmeras funções desempenhadas pela capa protéica de um vírus.

Vários trabalhos têm estudado essas múltiplas funções do capsídeo viral. Dolja et al. (1995) demonstraram que uma mutação na região central da capa protéica do *Tobacco etch virus* (TEV) impossibilitou seu movimento célula-a-célula. Outros trabalhos mostram que deleções nas porções amino- e carboxi-terminais da capa protéica de diferentes vírus impossibilitaram a sua movimentação a longas distâncias ou, ao contrário, que uma quimera com substituição de serina na posição 47 da capa protéica foi suficiente para permitir o movimento a longa distância do *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV) (ANDERSEN; JOHANSEN, 1998). Estudos com a capa protéica viral podem ser aplicados em várias áreas, incluindo resistência de plantas mediada por essa proteína (PRINS et al., 2009). Além disso, estudos de

variabilidade genética que envolvem a capa protéica (CP) viral são comuns. Estes estudos têm como objetivo desenvolver novas estratégias de controle da doença, afinal a CP pode estar associada, dentre outros fatores, à severidade de sintomas e gama de hospedeiros, como acontece para o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* – CMV), onde a alta variabilidade permitiu sua adaptação a um maior número de hospedeiros (ALI; ROOSSINCK, 2010). Vale ressaltar também que estudos com variabilidade genética foram essenciais para a criação da técnica de preimunização em plantas de citros para o vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) (SAMBADE et al., 2002). Os estudos de variabilidade consistem numa excelente ferramenta para a compreensão da evolução dos vírus, pois além da busca pelo manejo adequado de doenças virais, há também o risco da emergência de novos vírus (GLASA et al., 2011). Estes vírus emergentes geralmente causam doenças endêmicas em plantas e são capazes de superar a resistência de suas plantas hospedeiras (HARKINS et al., 2009). Além disso, a emergência de novos vírus pode dificultar sua detecção para diagnóstico.

Os estudos com mutações e variabilidade genética começaram com bacteriófagos em 1940 (citado por DUFFY et al., 2008). Inicialmente, essas variantes genéticas eram estudadas e caracterizadas por diferenças biológicas, como realizado no trabalho de Cunha Júnior et al. (2007), número de hospedeiros ou propriedades de transmissão de seus vetores. A partir daí, novas técnicas foram desenvolvidas a fim de otimizar a caracterização dos variantes. Atualmente, técnicas moleculares têm auxiliado sobremaneira nos estudos de variabilidade e caracterização de haplótipos virais. Até o início dos anos 2000, muitos trabalhos eram desenvolvidos utilizando-se a técnica de SSCP, ou polimorfismo da conformação de fita simples (KOENING et al., 1995; SHI et al., 1996; PALACIO; DURAN-VILA, 1999; KONG et al., 2000; RUBIO et al., 2001; D'URSO et al., 2003, KUBO et al., 2009). Recentemente, o sequenciamento, técnica mais eficiente, robusta e simples, tem sido mais utilizada para estudos de variabilidade. Afinal, o sequenciamento de regiões do genoma do vírus possibilita discriminar claramente as diferenças virais, suas taxas de mutação e informações sobre as sequências protéicas, como no estudo de Kubo et al. (2006), onde vários isolados do Orchid fleck virus (OFV) foram estudados. A técnica do sequenciamento e a utilização da capa protéica dos vírus para estudos de variabilidade tem sido foco de vários

trabalhos atuais (COX; JONES, 2010; OKANO et al., 2010; GLASA et al., 2011; WYLIE et al., 2011a; ZHANG; LING, 2011; FERRER et al., 2011).

Não há nenhum estudo publicado sobre a variabilidade do CiLV-C em hospedeiros alternativos, e as sequências virais nesses hospedeiros, quando disponíveis, são pequenas, apenas para a comprovação da identidade viral (LEON et al., 2008; FREITAS-ASTÚA et al., 2009; NUNES et al., 2012b). Além disso, as diferenças nas sequências de nucleotídeos entre os isolados parecem ser mínimas. No entanto, a crescente distribuição geográfica e gama de hospedeiras do CiLV-C, associados ao fato de que em ao menos um caso o vírus parece não conseguir mais infectar citros após sua passagem por um hospedeiro alternativo (*S. violaeifolium*) (RODRIGUES et al., 2005), sugerem a presença de mais de um haplótipo em isolados do CiLV-C, possivelmente com capacidade diferencial de adaptação em diferentes hospedeiros.

Em função disso, foi proposto o estudo da variabilidade da *p29* do CiLV-C, a fim de gerar informações relevantes acerca do patossistema e da prevalência de isolados, com possíveis implicações na epidemiologia da doença e seu manejo no campo, além de uma melhor compreensão sobre a evolução desse vírus, que até então nunca foi explorada.

### 3 OBJETIVOS

- Determinar se existem regiões da ORF *p29* do CiLV-C mais propensas à variabilidade através do sequenciamento completo dessa ORF de alguns isolados do vírus;
- Estudar a variabilidade da *p29* de isolados de CiLV-C provenientes de citros de diferentes regiões geográficas e de hospedeiros alternativos;
- Avaliar a resposta à leprose de tangerineiras e seus híbridos do Banco de Germoplasma de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal, ácaros e isolados do vírus

Ácaros planos foram coletados de citros e multiplicados sobre frutos de laranja doce (*Citrus sinensis*) no Laboratório de Acarologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC (CAPTACSM). Espécimes dessa população foram fixados em lâminas e observados em microscópio óptico com contraste de luz, conforme descrito por Flechtmann (1975). A confirmação da espécie como *Brevipalpus phoenicis* foi feita pela Dra. Maria Andréia Nunes, do CAPTACSM, sendo esses os ácaros utilizados durante todo o trabalho. Duas sub-populações foram mantidas: uma avirulífera e outra virulífera, obtidas através da multiplicação dos ácaros sobre frutos de laranja sadios ou com sintomas de leprose. As populações eram mantidas separadamente em uma sala para manutenção de ácaros, sobre frutos parafinados e pulverizados com uma mistura de farinha, gesso, areia fina e água para favorecer seu desenvolvimento (RODRIGUES et al., 2007). A presença do CiLV-C nos ácaros era monitorada por RT-PCR utilizando-se primers específicos que amplificam uma região na *mp* viral, conforme descrito em Kubo et al. (2011).

A planta a partir de onde eram coletados os frutos sintomáticos para a aquisição do vírus por parte dos ácaros e que servia como fonte de inóculo inicial para os experimentos de casa de vegetação localizava-se em uma propriedade particular no município de São José do Rio Preto, SP, afastada de outras plantas e de pomares de citros, e, portanto, pouco sujeita à contaminação com outros isolados do vírus. Frutos, folhas e ramos sintomáticos foram trazidos para o CAPTACSM, infestados com ácaros inicialmente avirulíferos e encostados em três plantas jovens (com cerca de três anos) de laranja doce Pera, por esta ser uma das variedades mais suscetíveis à doença (BITANCOURT, 1956; RODRIGUES et al., 2000a). Essas plantas apresentaram sintomas e foram mantidas em casa de vegetação como fonte de inóculo do vírus durante todo o trabalho.

Depois de estabelecidas as populações de ácaros e as fontes de inóculo, cinco plantas-teste de cada genótipo de citros (já devidamente enxertadas sobre porta-enxerto de limão Cravo) e de outras espécies vegetais (Tabela 1) foram infestadas com 10 ácaros virulíferos cada. Após um período de duas semanas, foi realizada infestação reforço com mais 10 ácaros virulíferos por planta, num total de

20 ácaros, exceto para as plantas de arabis, onde foram infestados ao todo dois ácaros por planta.

Como controle da inoculação, cinco mudas de laranja Pera, altamente suscetíveis à leprose, eram infestadas com ácaros virulíferos sempre que plantas de outro genótipo eram infestadas.

Tabela 1 - Relação das plantas-teste desafiadas com o vírus da leprose dos citros C através de infestação com ácaros *Brevipalpus phoenicis* virulíferos

<b>Nome Científico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Família botânica</b>
<b><i>Solanum violaeifolium</i></b>	Falsa hera	Solanaceae
<b><i>Malvaviscus mollis</i></b>	Malvavisco	Malvaceae
<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>	Feijão	Fabaceae
<b><i>Arabidopsis thaliana</i></b>	Arabidopsis	Brassicaceae
<b><i>Mimosa caesalpiniaefolia</i></b>	Sansão do campo	Leguminosae
<b><i>Commelina benghalensis</i></b>	Trapoeiraba	Commelinaceae
<b><i>Citrus limon</i></b>	Limão Siciliano	Rutaceae
<b><i>C. aurantiifolia</i></b>	Lima ácida Galego	Rutaceae
<b><i>C. latifolia</i></b>	Lima ácida Tahiti	Rutaceae
<b><i>C. limonia</i></b>	Limão Cravo	Rutaceae
<b><i>C. aurantium</i></b>	Laranja Azeda	Rutaceae
<b><i>C. sinensis</i></b>	Laranja Pera	Rutaceae
<b><i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i></b>	Tangor Ortanique	Rutaceae
<b><i>C. reticulata</i></b>	Tangerina Cravo	Rutaceae
<b><i>C. deliciosa</i></b>	Tangerina Tardia da Sicília	Rutaceae
<b><i>C. reshni</i></b>	Tangerina Cleópatra	Rutaceae
<b><i>C. reticulata</i></b>	Tangerina Vermelha	Rutaceae

A avaliação dos sintomas foi diária a partir de duas semanas após a infestação, exceto para feijão, trapoeiraba e arabis, com avaliações a partir de quatro dias. Foram determinados os tempos para o aparecimento dos sintomas e avaliados o desenvolvimento das lesões, as quais foram fotografadas. As folhas com lesões, ou folhas assintomáticas das plantas que não apresentaram lesões, foram submetidas à extração de RNA total com Trizol (Invitrogen), síntese de cDNA com

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), segundo informações do fabricante, e PCR. Para isso, foram desenhados primers específicos que amplificavam a ORF *p29* completa. Quatro pares de primers foram desenhados, com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Combinações entre os diferentes primers forward e reverse foram testadas e os amplicons foram observados em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 4.3.

Noventa dias após a transferência dos ácaros para plantas de citros, falsa hera, trapoeraba, malvavisco, sansão do campo, e 60 dias para plantas de feijão, os descendentes dos ácaros inicialmente transferidos para essas plantas foram transferidos para mudas de laranja doce Pera, onde permaneceram por 90 a 120 dias. Para as plantas de *arabidopsis*, o período entre infestação e transferência dos ácaros para plantas de Pera foi de sete dias, devido ao seu curto ciclo de vida. Os ácaros inicialmente transferidos para plantas de *arabidopsis* foram retirados após o aparecimento dos sintomas. Em seguida, as plantas foram infestadas com ácaros avirulíferos, para que estes adquirissem o vírus e o transmitisse para as plantas de Pera. Esse período entre infestação do hospedeiro alternativo e retorno para planta de citros deve-se ao ciclo de vida do *B. phoenicis*, que é de aproximadamente 19,2 dias (CHIAVEGATO, 1986).

Todos os sintomas que apareceram, sejam eles nos hospedeiros alternativos ou nas plantas de Pera, foram avaliados e foi feita a extração de RNA total das lesões. A *p29* do CiLV-C foi amplificada por RT-PCR, com os primers desenhados para essa ORF.

#### **4.2 Resposta de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros à leprose**

Foram avaliados 62 genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (BAG Citros IAC), com três repetições biológicas para cada genótipo. As plântulas de aproximadamente seis meses de idade foram obtidas de sementes e mantidas, em casa de vegetação, em tubetes com substrato apropriado até o final das avaliações. As plantas foram infestadas com ácaros virulíferos com isolados do vírus Cordeirópolis. Quatro avaliações foram realizadas em plantas jovens, através de uma escala de notas com cinco níveis de severidade (0=nenhuma lesão; a 5=quantidade abundante de lesões, mais seca de

ramos), desenvolvida por Rodrigues (2000b) e usada em estudos anteriores com tangerinas (BASTIANEL et al., 2008). As avaliações feitas foram baseadas apenas em sintomas visuais e não foi realizado estudo de variabilidade viral para esses genótipos, pois o intuito era apenas verificar a resposta dos mesmos à doença.

### **4.3 Sequenciamento e análise da variabilidade da *p29* do CiLV-C**

#### **4.3.1 Variabilidade do vírus em diferentes hospedeiros**

Com o intuito de determinar se há alteração na *p29* do CiLV-C de citros e outras hospedeiras, os primers 1-F e 3-R (F - ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGAC; R - CGAGTTTAGGTTGCTCTTTGAG) foram utilizados para a amplificação da ORF *p29* da planta fonte de inóculo original de citros, das plantas hospedeiras para onde o vírus foi inoculado por ácaros e das plantas de Pera que receberam novamente o vírus após a passagem do mesmo pelas hospedeiras alternativas. Para tanto, a extração do RNA total das amostras e a RT-PCR foram realizadas conforme descrição em LOCALI et al. (2003). Os amplicons foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. As reações de ligação e transformação foram feitas como descrito por SAMBROOK et al. (1989). Doze clones de cada uma das quatro plantas de cada genótipo (48 sequências no total) foram escolhidos para as reações de sequenciamento com os primers forward e reverse, realizadas de acordo com as instruções da Applied Biosystems para o “DNA sequencing Kit Big Dye Terminator cycle sequencing ready reaction”. O sequenciamento foi feito no Sequenciador automático ABI 3730 Applied Biosystems.

As sequências da planta original de citros (fonte de inóculo do vírus), as sequências obtidas das plantas hospedeiras, e aquelas obtidas de Pera (após a passagem pelos outros genótipos) foram então comparadas com as sequências da *p29* disponíveis no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1, DQ388512.1), para determinar se houve alguma alteração nessa ORF após a passagem do vírus por outro hospedeiro e, em caso afirmativo, qual seria o variante mais adaptado a qual hospedeiro. A análise de polimorfismos e estudo da variabilidade foram realizados através dos programas CLC Genomics e ClustalW (<http://align.genome.jp>). Além disso, foram feitos um cladograma e uma matriz de distância, utilizando o algoritmo Neighbor Joining com valores de bootstrap

calculados com 1000 replicatas, através do programa MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>).

#### 4.3.2 Sequenciamento e estudo de variabilidade das amostras de diferentes regiões geográficas

Todo o procedimento descrito no item 4.3.1 foi repetido para as 23 amostras oriundas de diferentes regiões geográficas (Figura 1), sendo uma amostra por localidade, incluindo laranjas Pera, Lima, Mimo do Céu, Valência, Hamlin, tangor Ortanique, tangerinas Cleópatra e Cravo.



Figura 1 - Distribuição das amostras de diferentes regiões geográficas.

As sequências foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1, DQ388512.1), e a análise de polimorfismos e o estudo da variabilidade foram realizados através dos programas CLC Genomics e ClustalW (<http://align.genome.jp>). O cladograma e a matriz de distância também foram feitos utilizando os mesmos parâmetros no programa MEGA 5.0.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Material vegetal, ácaros e isolados do vírus

Os ácaros utilizados nesse estudo possuíam quetotaxia dorsal opistosomal, que são os cinco pares de setas dorso-laterais e dois solenídeos no tarso II (Figura 2), características fundamentais para distinguir a espécie como *B. phoenicis* (WELBORN et al., 2003).

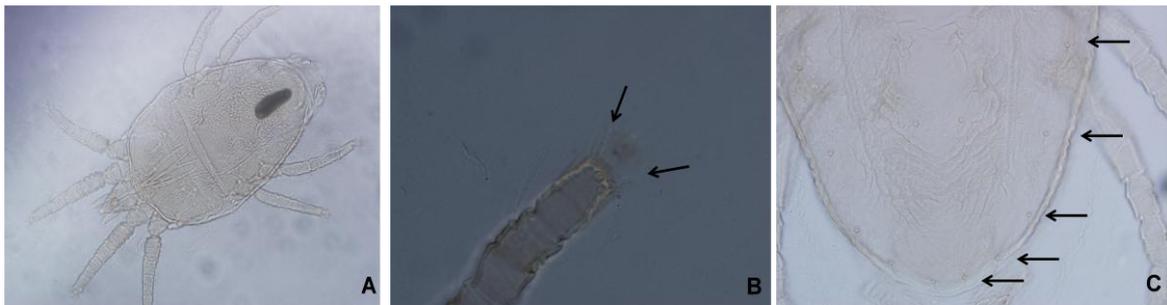


Figura 2 - A-*Brevipalpus phoenicis* fixado em lâmina. B-destaque nos dois solenídeos no tarso II. C-destaque para as cinco setas dorso-laterais (fotos: Dra. Maria Andréia Nunes, do Centro APTA Citros Sylvio Moreira).

As três plantas de Pera inoculadas com isolado original de São José do Rio Preto e mantidas em casa de vegetação apresentaram sintomas de leprose cerca de 40 dias após a infestação com ácaros virulíferos e foram mantidas como fonte de inóculo continuamente durante todo o trabalho.

De todos os genótipos testados, *Phaseolus vulgaris* e *Arabidopsis thaliana* tiveram que ser semeados e infestados várias vezes, por se tratarem de plantas com curto ciclo de vida. A tabela 2 traz o resultado de RT-PCR com primers *mp* usados para testes de diagnóstico rotineiros no laboratório.

Noventa dias após a infestação de citros, sansão do campo, falsa hera, trapoeraba e malvavisco, plantas de Pera foram encostadas a elas, estando com ou sem sintomas. Buscava-se passar para as plantas de Pera ácaros descendentes daqueles transferidos inicialmente e que tivessem adquirido o vírus através da alimentação nas plantas hospedeiras; afinal, não há transmissão transovariana do vírus para a progênie do ácaro (BASTIANEL et al., 2010) e, portanto, a alimentação do ácaro em material vegetal contaminado é a única forma de aquisição do vírus. A quantidade de plantas inoculadas e sintomáticas também encontra-se na Tabela 2. Consistentemente, todas as cinco plantas de Pera usadas como controle

apresentavam sintomas de 20 a 30 dias após infestação, evidenciando a eficiência da inoculação do vírus pelos ácaros.

Tabela 2 - Relação de plantas, aparecimento de sintomas e resultado de RT-PCR para a detecção do CiLV-C

Plantas-teste	Plantas inoculadas/ sintomáticas	Resultado de RT-PCR (testadas/ positivas)	Plantas de Pera encostadas total/ sintomáticas	Resultado de RT-PCR em plantas de Pera encostadas (testadas/ positivas)
Tangerina Cravo	5/5	5/5	5/5	5/5
Tangerina Tardia da Sicília	5/5	5/5	5/5	5/5
Tangerina Cleópatra	5/5	5/5	5/5	5/5
Tangerina Vermelha	5/5	5/5	5/5	5/5
Tangor Ortanique	5/5	5/5	5/5	5/5
Laranja Azeda	5/5	5/5	5/5	5/5
Limão Siciliano	5/0	5/0	5/0	5/0
Limão Cravo	5/0	5/0	5/0	5/0
Lima ácida Tahiti	5/0	5/0	5/0	5/0
Lima ácida Galego	5/0	5/0	5/0	5/0
Falsa hera	5/0	5/0	5/1	5/1
Malvavisco	5/0	5/0	5/2	5/2
Feijão	5/5	5/5		
Arabidopsis	36/20	36/20		
Sansão do campo	5/0	5/0	5/0	5/0
Trapoeraba	5/5	5/5	5/5	5/5

Os hospedeiros dentro do gênero *Citrus* (tangerinas Cravo, Tardia da Sicília, Cleópatra e Vermelha, tangor Ortanique e laranja Azeda) apresentaram sintomas, em média, 42 dias após a primeira infestação com ácaros. Embora as tangerinas apresentem menos sintomas em campo e sejam consideradas mais resistentes que as laranjas doces (Rodrigues et al., 2003), no trabalho de Freitas-Astúa et al. (2008) todas as tangerinas avaliadas apresentaram algum sintoma da doença. Além disso, o tangor Ortanique é conhecido pela suscetibilidade à leprose (Bastianel et al., 2008). A laranja Azeda também apresentou sintomas de CiLV-C (Figura 3), confirmado por RT-PCR, e foi capaz de transmitir o vírus para plantas de Pera, corroborando os relatos de Bittancourt (1955) e Boaretto (1994) sobre sua suscetibilidade à leprose com base em sintomas visuais.



Figura 3 - Sintomas de leprose em laranja Azeda após infestação com ácaros virulíferos.

As plantas de arabidopsis, feijão e trapoeraba apresentaram sintomas em 7, 10 e 15 dias após a infestação, respectivamente, e também apresentaram banda específica em gel de agarose, corroborando os trabalhos que já haviam relatado sintomas da doença nesses hospedeiros (KUBO et al., 2010; GROOT et al., 2006; NUNES et al., 2012b). É sabido que arabidopsis possui necessidades ambientais diferenciadas e, portanto, teve que ser mantida sob temperatura (22°C) e fotoperíodo (16 horas de luz) controlados. Embora se trate de uma planta supostamente de fácil manejo, várias plantas foram perdidas até que um protocolo de cultivo fosse estabelecido. Além disso, os sintomas eram muito pequenos (Figura 4) e, por isso, foi preciso coletar grande quantidade de material vegetal para a realização de RT-PCR.



Figura 4 - Sintomas de leprose em folhas de arabidopsis, após infestação com ácaros (foto: Gabriella Dias Arena, Centro APTA Citros Sylvio Moreira).

Para as plantas de curto ciclo de vida não foi possível montar o experimento com a garantia de que os ácaros usados na infestação inicial seriam totalmente

eliminados, como nas plantas de citros, para as quais foi estabelecido o período de 90 dias entre infestação e transferência dos ácaros. Nas plantas de feijão, a eliminação dos ácaros era inviável, afinal foram infestados 20 ácaros por planta; já nas plantas de arabidopsis, com apenas dois ácaros virulíferos por planta, a chance de transferi-los posteriormente para laranja Pera era menor. E, portanto, o experimento não obteve os resultados esperados, pois as plantas de feijão morreram antes que pudessem ser encostadas em plantas de Pera; por outro lado, as plantas de arabidopsis colocadas próximas às plantas de Pera não foram boas fontes de inóculo. Já as plantas de trapoeraba apresentaram sintomas característicos de leprose (Figura 5), corroborando trabalho anterior (NUNES et al. 2012b). As plantas de laranja Pera que foram encostadas após 90 dias nas plantas de trapoeraba também apresentaram sintomas em todas as repetições, mostrando que além de serem hospedeiras do vírus, as trapoerabas podem servir como fontes de inóculo do CiLV-C para citros.



Figura 5 - Sintomas de CiLV-C em folhas de trapoeraba, após infestação com ácaros virulíferos.

Dentre os genótipos de citros avaliados, quatro (limas ácidas e limões verdadeiros) não apresentaram sintomas. Esses resultados eram esperados, já que não há relatos de leprose infectando esses genótipos no campo e, segundo Rodrigues et al. (2003), eles apresentam alto grau de resistência à doença. No entanto, apesar de encontrarmos referências à resistência dessas espécies, não foi possível encontrar nenhum trabalho com inoculações controladas que evidenciasse

esse resultado. Portanto, esse é o primeiro trabalho do nosso conhecimento a mostrar o desafio dessas espécies de maneira sistemática.

Apesar de serem boas hospedeiras do ácaro, as plantas de sansão do campo não apresentaram sintomas de leprose, corroborando o trabalho de Nunes (2007), onde elas também permaneceram assintomáticas. O experimento para os limões e limas ácidas foi repetido e novas plantas de limão Siciliano, limão Cravo, lima ácida Tahiti e lima ácida Galego foram infestadas com 20 ácaros cada para comprovação dos resultados. Estas também não apresentaram sintomas, sugerindo alto grau de resistência ao CiLV-C. A observação de ácaros, tanto nas folhas dos limões e limas ácidas, quanto nas de laranja Pera que foram encostadas posteriormente nas plantas-teste era comum, o que indica que eles são favoráveis ao desenvolvimento do vetor, independentemente da suscetibilidade ao vírus.

Relato similar havia sido feito por Bastianel et al. (2006), para plantas de tangor Murcott e seus híbridos com laranja Pera, muitos deles resistentes ao vírus mas não ao ácaro. Portanto, não houve resistência de nenhum genótipo de citros testado à presença do ácaro vetor e as plantas assintomáticas (limões Siciliano e Cravo e limas ácidas Tahiti e Galego) foram de fato resistentes ao CiLV-C, já que, além de não apresentarem sintomas, não apresentaram também bandas específicas em gel de agarose quando submetidas a RT-PCR. Além disso, as plantas de Pera nelas encostadas também não apresentaram sintomas. Entretanto, as plantas de Pera usadas como controle apresentaram sintomas em todas as repetições, mostrando que não houve dificuldade de inoculação do vírus pelos ácaros.

Por outro lado, as plantas de falsa hera e malvavisco, embora tenham permanecido assintomáticas durante todo o experimento e negativas para o vírus por RT-PCR, demonstraram que são possíveis fontes de inóculo do CiLV-C para citros, pois proporcionaram a sua transmissão por ácaros para plantas de laranja Pera nelas encostadas. Nesse caso, considerando-se que o vírus não invade as plantas sistemicamente e não havia sintomas evidentes nas folhas, é possível que o resultado de RT-PCR tenha sido negativo devido ao efeito de diluição do vírus na folha toda. Como foram poucas as plantas de Pera sintomáticas a partir da infestação desses hospedeiros, é de supor que o título do vírus nessas espécies seja baixo. Embora haja um relato de falsa hera como hospedeira do vírus (RODRIGUES et al., 2005), os autores relataram que, após a passagem do CiLV-C

de citros para falsa hera, não era possível a transmissão do vírus por ácaros de volta para citros. Os resultados obtidos no presente trabalho são confiáveis, pois não apenas os ácaros só foram transferidos 90 dias após a infestação inicial, como o risco de contaminação com ácaros virulíferos de outras plantas foi minimizado devido à distribuição do experimento na casa de vegetação, com plantas distantes umas das outras. Sabe-se que o vírus da leprose se restringe às lesões oriundas da picada do ácaro, o que dificulta a detecção do mesmo por RT-PCR se houver baixo título viral no material vegetal. Isso pode ter ocorrido para as plantas de falsa hera e malvavisco, já que apenas uma das cinco plantas de Pera que foram encostadas em falsa hera e duas das cinco plantas de Pera encostadas em malvavisco apresentaram sintomas. Já as plantas de Pera controle usadas durante a infestação desses hospedeiros apresentaram sintomas em todas as repetições. Além disso, existem relatos da presença do vírus em plantas mesmo na ausência de sintomas (CHIAVEGATO; MISCHAN, 1987; BOARETTO, 1994; BASTIANEL et al., 2004). Como o período de desenvolvimento de ovo a adulto de *B. phoenicis* em citros é de aproximadamente 19,2 dias (CHIAVEGATO, 1986) e a longevidade dos ácaros adultos é em média de 30 dias, após 90 dias, os ácaros presentes nas plantas de falsa hera e malvavisco eram a progênie dos ácaros infestados inicialmente que adquiriam o vírus dessas plantas. Este foi o mesmo período adotado por Nunes et al. (2012a), o que garantiu a impossibilidade da inoculação ter sido do vírus que ainda estava presente nos ácaros originais. Assim, mesmo assintomáticas, as plantas de falsa hera e malvavisco parecem ser fontes de inóculo do vírus. Para confirmar os resultados, outras cinco plantas de falsa hera e malvavisco foram infestadas e, novamente, não apresentaram sintomas.

## **5.2 Resposta de genótipos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros à leprose**

Além do experimento conduzido com diferentes espécies vegetais como possíveis hospedeiros da leprose, um experimento paralelo, que avaliava a resposta de acessos de tangerinas (varias espécies) e híbridos de citros do BAG Citros IAC à doença também foi conduzido em casa de vegetação. Dos 62 genótipos avaliados, dentre eles a tangerina Cravo que é sabidamente suscetível à doença, 47 (75,8%) apresentaram sintomas de leprose em folhas e/ou ramos em diferentes níveis de

severidade (notas de 0 a 5) (Rodrigues, 2000b), e 15 (24,2%), dentre elas a tangerina Kara, se mostraram resistentes por não apresentarem sintomas de leprose, mesmo quando consideradas boas hospedeiras para os ácaros (Tabela 3). Entretanto, no trabalho conduzido por Freitas-Astúa et al. (2008) a tangerina Kara (acesso CV 178) apresentou (poucos) sintomas quando inoculadas com ácaros virulíferos em casa de vegetação. Essa divergência pode ter ocorrido em função do uso de diferente isolado do vírus e deve ser melhor investigada. Além disso, uma avaliação de campo é necessária; afinal, as plantas quando em campo podem se comportar diferentemente daquelas mantidas sob condições controladas. A distribuição das médias das notas de severidade concentrou-se entre 0-1 (Tabela 3), representando nenhum ou pouco sintoma, e demonstrando maior resistência do que as plantas de laranja, conforme esperado. Algumas variedades de tangerinas, mexericas e híbridos permaneceram assintomáticas, o que não tem sido observado em laranjas doce. Estudos conduzidos no Centro de Citricultura demonstram que não há resistência à leprose dentro deste grupo de citros (M. Bastianel, comunicação pessoal). Existem poucos estudos que buscam avaliar a resistência de tangerinas e híbridos à leprose. Estudos como este pode revelar variedades resistentes à doença, que podem, posteriormente, ser utilizadas em programas de melhoramento genético de citros, para obtenção de resistência varietal, que é uma das alternativas para reduzir o uso de pesticidas para o controle do vetor. Por outro lado, a identificação de tangerinas suscetíveis à leprose demonstra que a doença também pode assumir um sério problema fitossanitário neste grupo de citros, principalmente quando plantadas em regiões onde a doença é endêmica. Assim, apesar de apresentarem maior resistência do que as laranjas, elas não são imunes ao vírus e podem sofrer danos e perdas diretamente pela doença, além de servirem como fonte de inóculo para as laranjeiras plantadas na mesma área.

Tabela 3 - Relação de acessos de tangerinas e híbridos do BAG Citros IAC estudados e resposta à leprose dos citros em casa de vegetação. Em destaque, plantas assintomáticas

Nome do Acesso	Nº no BAG	Nº da planta			Média
		1	2	3	
tangerina King Orange	CN 212	0	4	0	1,33
tangerina Fortuna	CN 220	0	0	0	0

Tabela 3 - Relação de acessos de tangerinas e híbridos do BAG Citros IAC estudados e resposta à leprose dos citros em casa de vegetação.

Em destaque, plantas assintomáticas

<b>tangelo Webber</b>	CN 232	3	1	0	1,33
<b>tangelo Seminole</b>	CN 235	0	3	0	1
<b>tangelo Thorton</b>	CN 236	0	0	0	0
<b>tangelo São Jacinto</b>	CN 238	1	0	1	0,67
<b>tangor Sabará</b>	CN 241	0	2	0	0,67
<b>tangor Sangue de Boi</b>	CN 242	1	3	0	1,33
<b>tangor Tangerona</b>	CN 244	0	0	0	0
<b>tangor São Pedro</b>	CN 245	0	0	0	0
<b>tangor Jaboticaba</b>	CN 252	0	0	0	0
<b>tangor do Rei</b>	CN 255	4	4	0	2,67
<b>tangerina Osceola</b>	CN 503	2	0	2	1,33
<b>tangerina Batangas</b>	CN 504	4	3	3	3,33
<b>tangerina Vermelha - 15</b>	CN 508	1	1	1	1
<b>tangerina Vermelha - 14</b>	CN 506	1	0	0	0,33
<b>tangerina Vermelha - 12</b>	CN 510	0	4	1	1,67
<b>tangerina Israel</b>	CN 514	3	2	0	1,67
<b>tangerina Harris</b>	CN 516	0	1	0	0,33
<b>tangerina Thomas</b>	CN 519	1	1	2	1,33
<b>tangerina Cape Nartjee</b>	CN 522	0	2	0	0,67
<b>tangerina Szibat 16 x Tizon</b>	CN 524	0	1	0	0,33
<b>tangerina Depressa</b>	CN 525	4	2	4	3,33
<b>tangerina Kinnow</b>	CN 530	0	0	0	0
<b>tangerina Oneco</b>	CN 532	4	1	2	2,33
<b>tangerina Ladu</b>	CN 539	1	0	5	2
<b>tangerina Fremont</b>	CN 543	0	1	0	0,33
<b>tangerina da Venezuela</b>	CN 544	0	0	0	0
<b>tangerina Warnuco</b>	CN 547	2	1	1	1,33
<b>tangerina Ladu x Szinkon</b>	CN 552	0	0	0	0
<b>tangerina Rosehaugh Nartjee</b>	CN 555	0	0	0	0
<b>tangerina Szibat</b>	CN 558	1	4	0	1,67
<b>tangerina Heen Naran</b>	CN 559	0	0	1	0,33
<b>tangerina Szwikon x Szinkon Tizon</b>	CN 560	0	0	0	0
<b>tangerina Szinkon</b>	CN 564	0	0	0	0
<b>tangerina Empress</b>	CN 565	1	0	0	0,33
<b>tangerina Wilking</b>	CN 566	3	0	0	1

Tabela 3 - Relação de acessos de tangerinas e híbridos do BAG Citros IAC estudados e resposta à leprose dos citros em casa de vegetação. Em destaque, plantas assintomáticas

<b>tangerina Kara</b>	CN 570	0	0	0	0
<b>mexerica Sunwikon</b>	CN 576	3	1	2	2
<b>mexerica Pernambucana</b>	CN 578	1	1	1	1
<b>tangor 10630</b>	CN 579	0	0	4	1,33
<b>mexerica Precoce</b>	CN 581	0	1	0	0,33
<b>mexerica 114412</b>	CN 585	0	1	0	0,33
<b>mexerica do Céu</b>	CN 587	4	4	3	3,67
<b>tangor Hansen</b>	CN 596	0	0	4	1,33
<b>tangor Emperor</b>	CN 597	0	2	0	0,67
<b>mexerica Paraguai</b>	CN 600	4	0	0	1,33
<b>tangor Muscia</b>	CN 607	0	0	0	0
<b>tangerina Clementina</b>	CV 174	2	0	0	0,67
<b>tangerina Clementina</b>	CV 175	0	4	2	2
<b>tangerina Kinnow</b>	CV 176	4	4	2	3,33
<b>tangerina Kara</b>	CV 178	0	0	0	0
<b>tangerina Mel</b>	CV 180	0	0	0	0
<b>tangerina Cravo</b>	CV 182	1	0	1	0,67
<b>tangerina Portuguesa</b>	CV 186	0	0	2	0,67
<b>tangerina Sabará</b>	CV 210	0	0	0	0
<b>tangor Temple</b>	CV 214	4	1	4	3
<b>tangor Mimosa</b>	CV 215	0	1	0	0,33
<b>tangor Pera x Cravo</b>	CV 217	4	3	1	2,67
<b>tangor Baía x Cravo</b>	CV 218	4	4	0	2,67
<b>tangelo Orlando</b>	CV 225	2	1	0	1
<b>tangelo Seminole</b>	CV 226	0	0	0	0
<b>tangerina de Wildt</b>	CN 545	1	4	4	3

### 5.3 Sequenciamento e análise da variabilidade da *p29* do CiLV-C

#### 5.3.1 Variabilidade do vírus em diferentes hospedeiros

Não havia na literatura primers disponíveis para a amplificação da ORF *p29* completa e, em função disso, foram desenhados alguns pares de primers (Tabela 4). No entanto, a região 5' da ORF contém baixa %GC enquanto a região 3' contém alta %GC, tornando difícil o desenho de primers de boa qualidade. Para contornar

esse problema, além dos primers desenhados para a sequência completa da *p29* do CiLV-C, foram desenhados também primers acima e abaixo da mesma (Anexo A).

Tabela 4 - Relação dos primers desenhados para a amplificação da ORF *p29* do CiLV-C

Primer	Sequência
<b>p29 – 1 F</b>	5´ ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGAC 3´
<b>p29 – 1 R</b>	3´ CTACTGCGCTGAGTCGGA 5´
<b>p29 – 2 F</b>	5´ CCGCGAATTTGTATTTTGTC 3´
<b>p29 – 2 R</b>	3´ TTAATCCACCGACCTACTGCG 5´
<b>p29 – 3 F</b>	5´ CGAGTTTAGGTTGCTCTTTGAG 3´
<b>p29 – 3 R</b>	3´ ACCAGAGATTAGCGATTCAAAA 5´
<b>p29 – 4 F</b>	5´ ATTGATATTTTACCGCGAATTTGT 3´
<b>p29 – 4 R</b>	3´ TAATCTCCAGCACAAAAGTACCA 5´

Testes com diferentes temperaturas de anelamento (52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 60°C) foram feitos. No total, foram desenhados quatro pares de primers e testadas várias combinações entre eles, levando em conta temperaturas de anelamento próximas. A melhor combinação foi entre o primer 1 F e o primer 3 R e a temperatura usada foi 57°C, que resultou em bandas específicas de 863 pb em gel de agarose e foi usado em todo o trabalho. Em todos os casos, cuidados foram tomados para minimizar as taxas de erro, como o número de ciclos do RT-PCR limitado a 35 e o uso da enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Invitrogen).

Todas as análises das sequências só foram possíveis devido ao auxílio da Dra. Michèle Claire Breton, do Centro APTA Citros Sylvio Moreira. Primeiramente, foram clonados e sequenciados os produtos de RT-PCR de 16 folhas de uma mesma árvore de São José do Rio Preto (SJRP) com 12 sequências cada, totalizando 192 sequências virais. Essas informações resultaram no que foi considerado o isolado padrão do vírus para o presente trabalho. Era necessário ter um conhecimento prévio da variabilidade genética do vírus dentro da população padrão para que posteriores comparações pudessem ser feitas. As sequências de SJRP se agruparam em um contig com poucas variações entre elas, sendo que nenhuma das variações de nucleotídeos alterava aminoácidos. A sequência-

consenso foi usada para posteriores comparações. No entanto, foram observadas alterações significativas entre o consenso de SJRP e as outras sequências disponíveis no GenBank. Das três sequências da *p29* disponíveis no banco de dados, duas são brasileiras e uma do Panamá e a similaridade entre elas é de 99%, com apenas oito nucleotídeos diferentes no total de 792. Já quando comparadas com a sequência de SJRP, a similaridade é de 85%.

Os isolados do CiLV-C dos hospedeiros tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, tangerina Vermelha e suas respectivas laranjas Pera-controle foram sequenciados e as 48 sequências foram comparadas com a sequência consenso de SJRP e com aquelas da *p29* depositadas no GenBank. Uma inserção de seis nucleotídeos (CCCGCA) estava presente nas sequências de São José do Rio Preto original e em todos os demais hospedeiros inoculados a partir desse isolado, mas estava ausente nas sequências da *p29* depositadas no GenBank. Essa inserção deu origem a dois aminoácidos, que podem ter causado alterações na conformação da proteína (Anexo C). Além disso, foram calculadas as frequências em que as mutações ocorriam num total de sequências analisadas para cada genótipo e em qual genótipo essas mutações ocorriam (SJRP, tangerinas Cleópatra, Vermelha, tangor Ortanique, Peras correspondentes a cada um dos genótipos ou todos). Do total de 477 sequências obtidas, 189 correspondiam a amostras de SJRP; 48 a Cleópatra, 48 a Pera após passagem por Cleópatra, 48 a Ortanique, 48 a Pera após passagem por Ortanique, 48 a tangerina Vermelha e 48 a Pera após passagem por tangerina Vermelha (Tabela 5).

As alterações em nucleotídeos nas sequências de SJRP e demais hospedeiros eram compartilhadas, mas diferiam das sequências da *p29* depositadas no GenBank em torno de 16,4%, ou 130 nucleotídeos, num total de 792 nucleotídeos da ORF completa (Anexo B). Dessas alterações, três eram compartilhadas com alterações no acesso DQ157466 (PASCON et al., 2006). As alterações observadas nas sequências de SJRP permaneceram constantes nos outros hospedeiros, pois provavelmente nenhuma das mutações alterou a função principal da possível capa protéica viral. Apenas cerca de 18% das mutações nas sequências de São José do Rio Preto, tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, tangerina Vermelha e respectivas plantas de Pera resultaram na mudança de aminoácidos, quando comparadas com as sequências da *p29* depositadas no

GenBank e as demais foram mutações silenciosas (Tabela 5). As alterações parecem estar distribuídas ao longo das sequências sem que tenha sido possível identificar região livre de mutações ou hot spot de mutações (Anexo B). A tangerina Vermelha e sua laranja Pera-controle apresentaram três mudanças em nucleotídeos diferentes das demais sequências. Essas alterações resultaram na mudança de dois aminoácidos adjacentes que talvez sejam necessários para que o vírus possa colonizar esse hospedeiro. Além disso, na tabela 5 pôde-se observar que houve 23 substituições de aminoácidos. Destas, 56% delas são pelo mesmo tipo de aminoácido, o que, provavelmente, não traz maiores consequências em sua função e não deve apresentar efeito biológico importante. Entretanto, foi possível identificar substituições onde houve mudanças nas cargas elétricas dos mesmos. A substituição mais observada foi a troca de aminoácidos apolares por polares neutros com 40% de frequência. Isso pode ter implicação na função da proteína, já que a alteração de um único aminoácido com carga diferente pode alterar o empacotamento da mesma.

Tabela 5 - Variação de códons e aminoácidos da sequência da *p29* do vírus da leprose do citros C (CiLV-C) entre as amostras analisadas em comparação ao consenso das três sequências depositadas no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1 e DQ388512.1)

Alteração de bases no códon	Posição	Frequência*	Alteração de aminoácido	Posição	Amostras em que ocorre a mutação
GAG/GAA	642	99,7%	Mutação silenciosa		Todas**
CAA/CAG	648	100%	Mutação silenciosa		Todas
TTG/TCG	651	100%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/CCG	654	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
CGC/CAT	657, 658	100%	Mutação silenciosa		SJRP
CTC/TTA	658, 660	99,7%	Ácido aspártico(D)/Asparagina (N)	36	Todas
CAG/CAA	675	99,5%	Isoleucina (I)/Fenilalanina (F)	37	Todas
AAT/AAC	684	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
CAC/CAT	693	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAA/GAT	696	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/TTG	697	100%	Treonina (T)/Ácido aspártico (D)	41	Todas
GGC/GGT	702	99,7%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTA	709	99,8%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/CTT	725	98,5%	Leucina (L)/ Prolina (P)	52	Todas
TTA/CTT	733, 735	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	750	100%	Mutação silenciosa		Todas
GTC/GTT	762	100%	Prolina (P)/Serina (S)	59	Todas
GAG/GGG	770	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAT	774	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/GAA	780	100%	Glicina (G)/Serina (S)	65	Todas
GAC/CAA	784/786	100%	Prolina (P)/Treonina (T)	66	Todas
GCG/GAG	791	37,1%	Mutação silenciosa		Todas

Tabela 5 - Variação de códons e aminoácidos da sequência da p29 do vírus da leprose do citros C (CiLV-C) entre as amostras analisadas em comparação ao consenso das três sequências depositadas no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1 e DQ388512.1)

TAG/TAA	798	37,1%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAA	642	37,1%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	648	37,1%	Alanina (A)/Glicina (G)	75	Todas
TTG/TCG	651	69,4%	Mutação silenciosa		Cleópatra *** Cleópatra/ Pera Ortanique Ortanique /Pera Tangerina vermelha Tangerina vermelha/ Pera
CTG/CCG	654	36,9%	Mutação silenciosa		Todas
CGC/CAT	657	36,9%	Alanina (A)/Valina (V)	79	Todas
CTC/TTA	658, 660	36,9%	Mutação silenciosa		Todas
CAG/CAA	675	37,1%	Inserção de uma Prolina (P)	83	Todas
AAT/AAC	684	37,1%	Inserção de uma Glutamina (Q)	84	Todas
CAC/CAT	693	37,1%	Prolina (P)/Leucina (L)	86	Todas
GAA/GAT	696	36,9%	Prolina (P)/Leucina (L)	91	Todas
CTG/TTG	697	37,1%	Prolina (P)/Alanina (A)	93	Todas
GGC/GGT	702	36,6%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTA	709	37,2%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/CTT	725	37,1%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTT	733, 735	36,9%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	750	34,4%	Mutação silenciosa		Todas
GTC/GTT	762	37,1%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GGG	770	36,8%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAT	774	36,4%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/GAA	780	35,5%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/CAA	784/786	36,4%	Mutação silenciosa		Todas
GCG/GAG	791	36,1%	Mutação silenciosa		Todas
TAG/TAA	798	83,3%	Ácido aspártico (D)/Ácido glutâmico (E)	139	Tangerina vermelha/ Pera
GAG/GAA	642	98,7%	Mutação silenciosa	139	SJRP
CAA/CAG	648	94,3%	Fenilalanina (F)/Cisteína (C)	140	Tangerina vermelha Tangerina vermelha/Pera
TTG/TCG	651	96,4%	Lisina (K)/Ácido glutâmico (E)	141	Tangerina vermelha Tangerina vermelha/Pera
CTG/CCG	654	100%	Mutação silenciosa		Todas
CGC/CAT	657	99,4%	Mutação silenciosa		Todas
CTC/TTA	658, 660	99,5%	Mutação silenciosa		SJRP Cleopatra Cleopatra/Pera Ortanique Tangerina vermelha Tangerina vermelha/Pera
CAG/CAA	675	100%	Mutação silenciosa		Todas
AAT/AAC	684	97,6%	Mutação silenciosa		Todas
CAC/CAT	693	99,1%	Serina (S)/Asparagina (N)	153	Todas
GAA/GAT	696	99,8%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/TTG	697	36,8%	Mutação silenciosa		Todas
GGC/GGT	702	98,5%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTA	709	99,5%	Serina (S)/Treonina (T)	160	Todas
CTG/CTT	725	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTT	733, 735	99,7%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	750	99,6%	Mutação silenciosa		Todas

Tabela 5 - Variação de códons e aminoácidos da sequência da *p29* do vírus da leprose do citros C (CiLV-C) entre as amostras analisadas em comparação ao consenso das três sequências depositadas no GenBank (acessos DQ157466.1, DQ352194.1 e DQ388512.1)

GTC/GTT	762	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GGG	770	99,1%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAT	774	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/GAA	780	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/CAA	784/786	99,7%	Mutação silenciosa		Todas
GCG/GAG	791	99,8%	Mutação silenciosa		Todas
TAG/TAA	798	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAA	642	100%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	648	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
TTG/TCG	651	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/CCG	654	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
CGC/CAT	657	100%	Mutação silenciosa		Todas
CTC/TTA	658, 660	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
CAG/CAA	675	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
AAT/AAC	684	100%	Mutação silenciosa		Todas
CAC/CAT	693	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAA/GAT	696	56,6%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/TTG	697	99,1%	Mutação silenciosa		Todas
GGC/GGT	702	99,5%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTA	709	99,5%	Mutação silenciosa		Todas
CTG/CTT	725	99,1%	Mutação silenciosa		Todas
TTA/CTT	733, 735	100%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	750	100%	Mutação silenciosa		Todas
GTC/GTT	762	99,9%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GGG	770	99,6%	Ácido glutâmico (E)/Ácido aspártico (D)	232	Todas
GAG/GAT	774	99,7%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/GAA	780	99,2%	Mutação silenciosa		Todas
GAC/CAA	784/786	99,6%	Mutação silenciosa		Todas
GCG/GAG	791	100%	Mutação silenciosa		Todas
TAG/TAA	798	100%	Mutação silenciosa		Todas
GAG/GAA	642	99,1%	Mutação silenciosa		Todas
CAA/CAG	648	99,7%	Mutação silenciosa		Todas
TTG/TCG	651	99,8%	Ácido glutâmico (E)/Glicina (G)	257	Todas
CTG/CCG	654	99,8%	Ácido glutâmico (E)/Ácido aspártico (D)	258	Todas
CGC/CAT	657	99,8%	Ácido aspártico (D)/Ácido glutâmico (E)	260	Todas
CTC/TTA	658, 660	100%	Ácido aspártico (D)/Glutamina (Q)	262	Todas
CAG/CAA	675	99,8%	Alanina (A)/Ácido glutâmico	264	Todas
AAT/AAC	684	99,6%	Mutação silenciosa	266	Todas

\* em relação ao total de sequências analisadas. (SJRP=189 sequências; Cleopatra =48 sequências; Pera-controle=48 sequências; Ortanique =48 sequências; Pera-controle=48 sequências; Tangerina vermelha =48 sequências; Pera-controle=48 sequências).

\*\* Todas= sequências da *p29* de isolado de CiLV-C de São José do Rio Preto (SJRP), Cleopatra, Ortanique, Tangerina vermelha e suas respectivas Peras-controles.

\*\*\*Cleopatra/ Pera= sequências da *p29* de isolado de CiLV-C provenientes de laranja Pera após passagem por (hospedeiro), nesse caso, tangerina Cleopatra.

O isolado de São José do Rio Preto foi escolhido ao acaso e pareceu ser divergente das sequências da *p29* disponíveis no GenBank. As alterações nas sequências dessa população inicial foram observadas também nos hospedeiros para

onde o inóculo foi transmitido, como esperado. Esses resultados sugerem que não há diferença significativa entre haplótipos de CiLV-C encontrados nos diferentes hospedeiros a partir de uma população viral única; entretanto, existe diferença significativa quando estes foram comparados com as sequências depositadas no Genbank. Estudos com alguns fitovírus de ampla gama de hospedeira e reconhecida elevada variabilidade genética, como o vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) evidenciam que após 24 horas em protoplastos, o vírus foi capaz de gerar alta variação em sua sequência (SCHNEIDER; ROOSSINCK, 2001). No geral, isso não foi verificado para o CiLV-C quando transmitido para diferentes hospedeiros; no entanto, pelo menos cinco alterações de nucleotídeos distintos daqueles presentes na população original puderam ser identificados, sendo que em três delas houve alteração também do aminoácido correspondente (Tabela 5).

Um cladograma (Figura 6) e uma matriz de distância (Figura 7), construídos com o auxílio do programa Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>), foram feitos a partir do alinhamento das sequências consenso de SJRP, hospedeiros alternativos, suas respectivas laranjas Pera, sequências da *p29* disponíveis no Genbank e sequência da *p29* do Hibiscus green spot virus, um outro vírus transmitido por ácaros *Brevipalpus* recentemente reportado por Melzer et al. (2012), que foi usada como grupo externo. Foi utilizado o algoritmo Neighbor Joining com valores de bootstrap calculados com 1000 replicatas e corroboraram os resultados já obtidos. A.

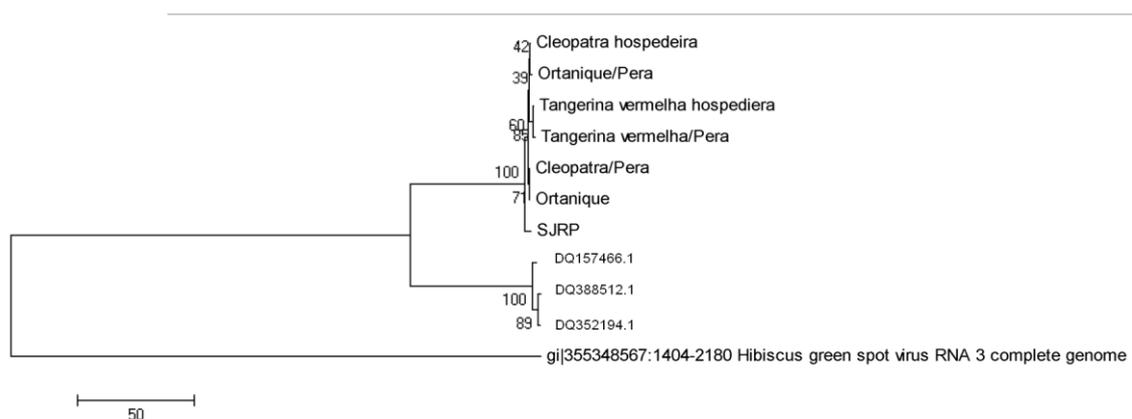


Figura 6 - Cladograma construído utilizando o algoritmo Neighbor Joining com valores de bootstrap calculados com 1000 replicatas a partir do alinhamento das sequências da *p29* do CiLV-C dos diferentes hospedeiros, das respectivas Pera, das sequências depositadas no GenBank (Local=DQ352194.1; Pascon=DQ157466.1; Guerra=DQ388512.1) e do Hibiscus green spot vírus, um vírus também transmitido por *B. phonicis*.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
SJRP (I)										
Cleopatra (II)	99									
Cleopatra/Pera (III)	99	100								
Tangerina_vermelha (IV)	99	100	100							
Tangerina_vermelha/Pera (V)	99	100	99	100						
Ortanique (VI)	99	100	100	100	99					
Ortanique/Pera (VII)	99	100	100	100	99	100				
DQ157466.1 (VIII)	84	84	84	84	84	84	84			
DQ352194.1 (IX)	84	84	84	84	84	84	84	99		
DQ388512.1 (X)	84	84	84	84	84	84	84	99	100	

Figura 7 - Matriz de distância calculada entre as sequências consenso da *p29* do CiLV-C dos diferentes hospedeiros, respectivas laranjas Pera, e sequências depositadas no GenBank. Os valores de cor vermelha representam aqueles mais próximos, os de cor azul, os mais distantes e valores de cor amarela, os medianos.

Através do cladograma e da matriz de distância, foi possível observar que as sequências da *p29* do CiLV-C dos diferentes hospedeiros, de suas respectivas laranjas Pera e de SJRP divergem das sequências disponíveis no GenBank, assim como já havia sido observado no alinhamento das sequências. Entretanto, as sequências depositadas no GenBank não diferem entre si.

Baseado nos resultados, foi possível diferenciar o isolado inicial desse estudo (e sua passagem para outros hospedeiros) daqueles com sequências depositadas no GenBank. Entretanto, a separação de isolados do vírus de acordo com seu hospedeiro não foi possível, pois as sequências dos isolados de tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, tangerina Vermelha e suas respectivas laranjas Pera foram muito semelhantes entre si, com exceção da tangerina Vermelha e sua laranja Pera, que apresentaram dois aminoácidos distintos. A baixa variação da sequência da *p29* observada pode estar relacionada com o longo tempo que o vírus permanece na planta, perene, e no vetor, que pode retê-lo por toda a vida. Há relatos de que quando as proteínas da capa protéica de um vírus interagem tanto com o hospedeiro quanto com o vetor elas são submetidas a maior pressão seletiva para permanecerem conservadas, afinal devem passar pelas seleções no hospedeiro e no vetor (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Outro fator que pode ter contribuído para a baixa variabilidade do vírus é que todos os hospedeiros eram suscetíveis à doença e, por isso, talvez não tenha sido necessária uma variação no seu genoma para uma adaptação, como aquela reportada em plantas resistentes e/ou tolerantes à doença no trabalho de Acosta-Leal et al. (2010). Nesse trabalho, as sequências dos isolados das plantas assintomáticas foram até cinco vezes mais divergentes que as das

plantas sintomáticas. A alta estabilidade também parece ser comum entre vírus infectando seus hospedeiros compatíveis, o que sugere que o vírus não precisa mudar enquanto interage com seu hospedeiro natural (GARCIA-ARENAL et al., 2003). Por outro lado, as taxas de mutações costumam ser altas quando o vírus tem que se adaptar a um novo hospedeiro (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Nesse tocante, apesar de tangerinas Cleópatra e Vermelha, e tangor Ortanique não serem novos hospedeiros do CiLV-C, eles certamente são hospedeiros pouco frequentes do vírus. É de se perguntar se as alterações de aminoácidos observadas em tangerina Vermelha em tão curto período de tempo estão relacionadas com a melhor adaptabilidade desse haplótipo a essa variedade. A baixa variação nas sequências também pode ser devido ao efeito gargalo que reduz a variabilidade genética e é muito comum entre os vírus transmitidos por vetores e que movem de planta a planta. Esse efeito gargalo pode ocorrer durante a inoculação do vírus pelo vetor, movimento célula a célula, entrada no tecido específico, aquisição pelo vetor, entre outros (LI; ROOSSINCK, 2004). Após repetidas infecções entre hospedeiros do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) apresentou um número similar de haplótipos que inicialmente infectou o primeiro hospedeiro (FRENCH; STENGER, 2005).

O efeito gargalo é crucial para a preservação do genoma parental, mantendo os mutantes adaptativos (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Com o efeito gargalo, somente os genomas mais adaptados são capazes de infectar a maioria das células e, conseqüentemente, a diversidade genética diminui (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Uma alta taxa de variabilidade genética não é sempre vantajosa para os vírus, pois algumas mutações podem ser letais e a população viral pode ser erradicada. Um exemplo foram as várias passagens de um isolado selvagem de *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) através de beterrabas altamente resistentes que resultou em variação genética tão grande que, em algumas linhagens, a infecção viral foi gradualmente eliminada (ACOSTA-LEAL et al., 2010). Além disso, se um vírus atingiu um nível adaptativo em que não há danos significativos à sua cultura, é bem provável que ele persista nessas condições por um longo período (ACOSTA-LEAL et al., 2011).

Embora o atual estudo tenha gerado grande quantidade de dados, os estudos de variabilidade genética baseados em apenas um fragmento do genoma viral não são suficientes, como mostrado no trabalho de Glasa et al. (2011), no qual foi

estudada a variabilidade genética de fragmentos genômicos de 36 isolados de *Watermelon mosaic virus* (WMV) da Eslováquia e Irã. Por isso, mais estudos devem ser conduzidos com o intuito de contribuir para o conhecimento da variabilidade genética do vírus da leprose até então não explorada.

### 5.3.2 Sequenciamento e estudo de variabilidade das amostras de diferentes regiões geográficas

Os produtos de RT-PCR de 23 amostras de diferentes regiões geográficas, incluindo a amostra oriunda de São José do Rio Preto (SJRP) usada como controle, foram sequenciados e analisados em busca de variabilidade genética da *p29*, sendo uma amostra por região geográfica, coletadas de diferentes espécies vegetais, tais como laranjas Pera, Lima, Mimo do Céu, Valência, Hamlin, tangor Ortanique, tangerinas Cleópatra e Cravo.

As amostras foram analisadas separadamente. Cada região geográfica resultou em um único contig e cada contig agrupou um número distinto de sequências (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação do número de sequências agrupadas nos contigs gerados pelas amostras das diferentes localidades

Localidade	Número de sequências
Alfenas/MG	12
Argentina	12
Borborema/SP	12
Brasília/DF	11
Campinas/SP	9
Comendador Gomes/MG	12
Cordeirópolis/SP	11
Goiânia/GO	11
Londrina/PR	11
Manaus/AM	10
Maringá/PR	9
Mirandópolis/SP	11
Nova Erechim/SC	10
Nova Itaberaba/SC	12
Pará	9
Piracicaba/SP	11
Planaltina/DF	11
Rio Branco/AC	12
Serra Negra/SP	10
SJRP/SP	12
Sta Cruz da Conceição/SP	11
Tocantins	9
Ubarama/SP	12

O alinhamento desses contigs (Anexo D) mostrou que as sequências de SJRP foram divergentes das demais, assim como já havia sido observado no experimento anterior. A similaridade da sequência de SJRP com as sequências depositadas no GenBank é igual a 85%, enquanto as demais sequências são em média 99% similares entre si. Além da sequência de SJRP, a sequência com o maior número de alterações de nucleotídeos foi a de Mirandópolis (14 nucleotídeos alterados); as com menor número de nucleotídeos alterados foram a de Santa Cruz da Conceição e Tocantins, com apenas quatro alterações ao longo da sequência. Quando as sequências foram traduzidas para aminoácidos (Anexo E) o resultado permaneceu igual e aproximadamente 63% das alterações de nucleotídeos da sequência de SJRP resultaram na alteração de aminoácidos e em média 25% das demais sequências de nucleotídeos alteraram aminoácidos.

Os resultados sugerem que as sequências apresentaram variabilidade genética, mas esta não está associada a localidade, assim como no trabalho de Kubo et al. (2006), onde foram analisadas 48 amostras de orquídeas coletadas no Brasil, Costa Rica e Austrália. O agrupamento baseado nas espécies também não aconteceu, assim como também não foi possível determinar a relação entre os hospedeiros tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, tangerina Vermelha e respectivas laranjas Pera no experimento descrito anteriormente. Vale ressaltar, no entanto, que a amostragem era pequena e, para que as informações sejam conclusivas, é necessário número maior de amostras.

Foi possível notar uma clara separação das amostras de diferentes regiões geográficas em dois grupos, um em que a maioria das amostras estavam inseridas e outro com maior variabilidade, que incluía o isolado usado como padrão. Vale ressaltar, no entanto, que mesmo com incidência baixa, os variantes podem ser capazes de se adaptar facilmente e aumentar sua incidência dentro da população (ACOSTA-LEAL et al., 2011). Sabe-se que os vírus com material genético de RNA, como o da leprose, possuem um potencial maior de variabilidade (COX; JONES, 2010; OKANO et al., 2010; GLASA et al., 2011; WYLIE et al., 2011a; ZHANG et al., 2011, FERRER et al., 2011), mas existem também exceções a essa regra (KUBO et al., 2009; JANSSEN et al., 2007). LOCALI (2006) observou baixa variabilidade genética do CiLV-C para os genes que codificam as possíveis replicase e proteína

de movimento, para isolados do Estado de São Paulo. Entretanto, essas regiões são consideradas mais conservadas e a baixa variabilidade era esperada.

Um cladograma (Figura 8) e uma matriz de distância (Figura 9) foram construídos utilizando o algoritmo Neighbor Joining com valores de bootstrap calculados com 1000 replicatas, com o auxílio do programa MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>), para confirmar os resultados obtidos com o alinhamento das sequências de diferentes regiões geográficas, incluindo a de SJRP, e sequências da *p29* disponíveis no GenBank.

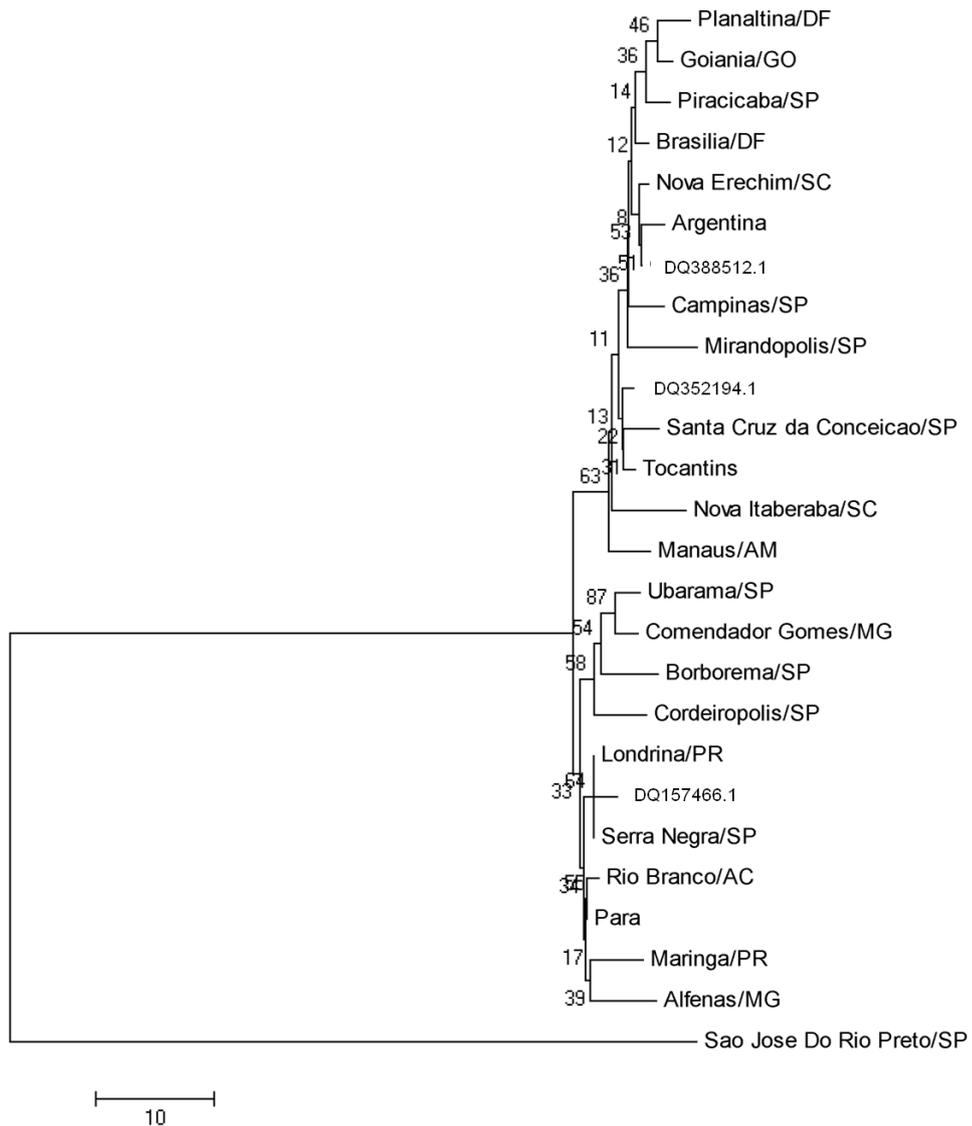


Figura 8 - Cladograma contruído utilizando o algoritmo Neighbor Joining, com valores de bootstrap com 1000 replicatas, a partir do alinhamento das sequências da *p29* das diferentes regiões geográficas e sequências depositadas no GenBank (Locali=DQ352194.1; Pascon=DQ157466.1; Guerra=DQ388512.1).

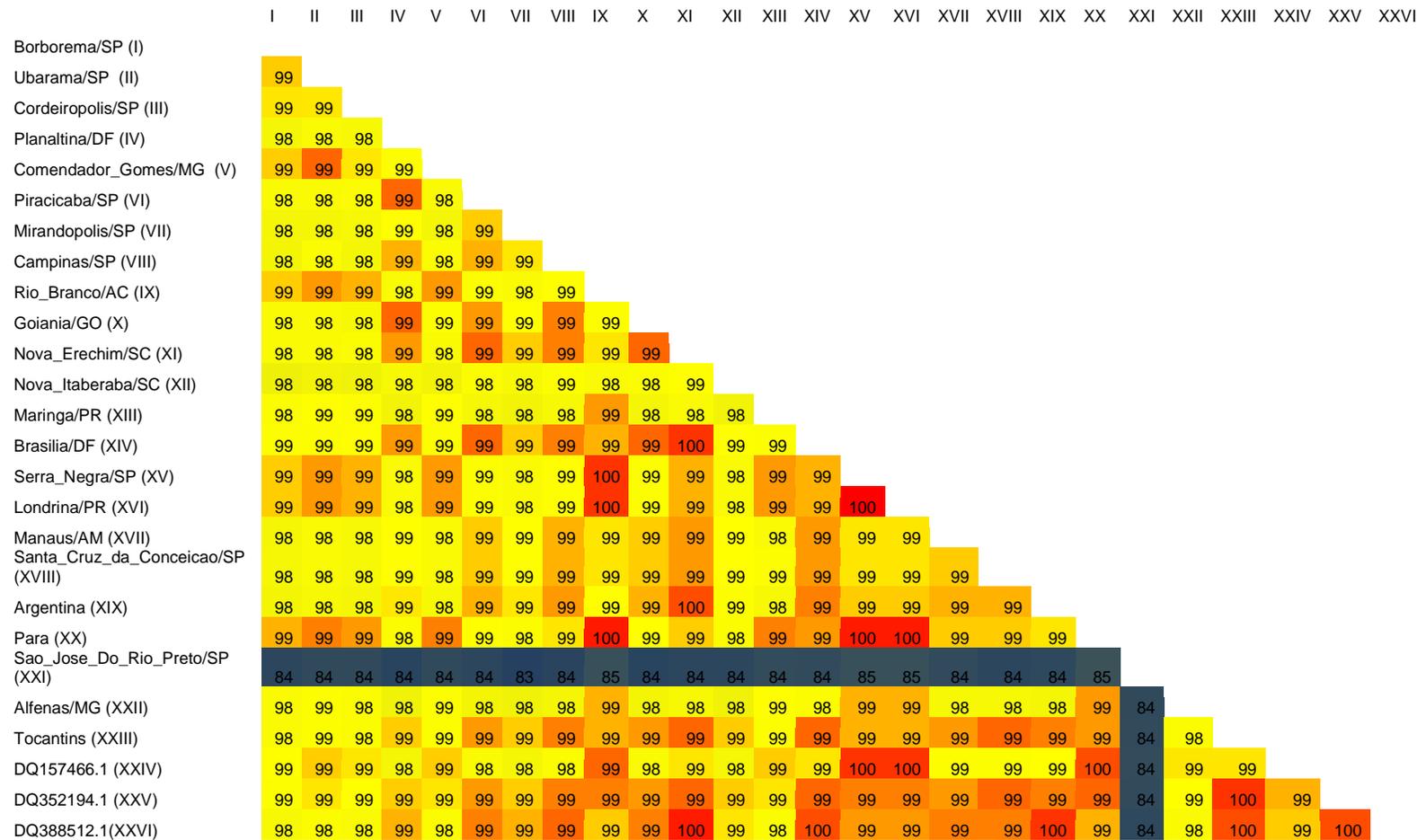


Figura 9 - Matriz de distância, com valores em porcentagem calculados entre as sequências da *p29* das diferentes regiões geográficas e sequências depositadas no GenBank. Os valores de cor vermelha representam aqueles mais próximos, os de cor azul, os mais distantes e valores de cor amarela, os medianos.

Este estudo, pioneiro em variabilidade da *p29* do vírus da leprose, foi capaz de gerar muitas informações relevantes. Os resultados sugerem que o vírus possui variabilidade, pode estar se modificando e talvez tornando-se um vírus emergente. Por outro lado, por muito tempo ele parece ter permanecido estável, haja vista as sequências disponíveis no GenBank que possuem poucas diferenças entre si, mesmo sendo de diferentes regiões geográficas (Campinas, Cordeirópolis e Panamá). E segundo as análises das sequências dos isolados de diferentes regiões geográficas existem vários isolados com pequenas alterações de nucleotídeos e aminoácidos quando comparados com as sequências disponíveis no GenBank. Entretanto, o isolado de São José do Rio Preto pareceu diferir e possuir um padrão próprio de mutações que permaneceu durante sua transmissão para diferentes plantas. Embora a maioria dessas mutações tenha sido silenciosa, o que geralmente não altera nem estrutura e nem função das proteínas posteriormente sintetizadas, houve também algumas mutações que alteraram aminoácidos, em alguns casos com alteração de polaridade, o que pode resultar em mudanças significativas na estrutura e função da proteína. No entanto, não é possível saber se essas mutações são relevantes para a adaptabilidade da população viral.

A variabilidade genética observada nesse estudo, embora não esperada, pareceu ser significativa, afinal a identidade ou similaridade entre as sequências de nucleotídeos da *p29* do CiLV-C de São José do Rio Preto e aquelas depositadas do GenBank foi 85% e 89% entre as sequências de aminoácidos, o que podem ser considerados um valores baixos. Afinal, valores inferiores a 89% de identidade entre genomas são usados para distinguir novas espécies para os gêneros *Begomovirus* e *Curtovirus* (BROWN et al., 2012). E Torres et al. (2012) sugerem que valores de similaridade inferiores a 90% entre sequências da proteína N, uma proteína de nucleocapsídeo, é suficiente para distinguir uma nova espécie de tospovirus. Entretanto, não há um valor de identidade definido para *Cilevirus*. Por isso, não se pode afirmar que o isolado de São José do Rio Preto é uma nova espécie de *Cilevirus*, sendo necessários estudos posteriores para investigar essa possibilidade.



## 6 CONCLUSÕES

- As plantas de tangerinas Cravo, Tardia da Sicília, Cleópatra, Vermelha, tangor Ortanique, laranja Azeda e trapoeraba são suscetíveis à leprose e também capazes de servir como fonte de inóculo do vírus para citros.
- As plantas de limões Siciliano e Cravo, limas ácidas Tahiti e Galego e sansão do campo mostraram-se resistentes à doença, mas não à colonização pelo ácaro vetor.
- As plantas de malvavisco e falsa hera não apresentaram sintomas, mas foram capazes de servir como fonte de inóculo para plantas de citros.
- Dos 62 acessos de tangerinas e híbridos avaliados, 15 mostraram-se resistentes à doença e poderiam ser utilizados em programas de melhoramento genético visando a resistência à leprose.
- O isolado de São José do Rio Preto diferiu significativamente dos demais isolados sequenciados e disponíveis no GenBank e as alterações permaneceram em diferentes hospedeiras inoculadas a partir desse isolado.
- O estudo evidenciou baixa variabilidade genética entre os isolados do CiLV-C de diferentes regiões geográficas e não foi possível relacionar essa variabilidade com localidade das amostras; entretanto, o isolado de São José do Rio Preto diferiu de todas as demais sequências.
- A maioria das mutações que ocorreram nas sequências de nucleotídeos analisadas foi silenciosa. No entanto, algumas das alterações que resultaram na mudança de aminoácido resultaram também na mudança de sua polaridade, o que pode ter implicação na estrutura e função da proteína.
- Mais estudos devem ser conduzidos para gerar resultados mais robustos; entretanto, os resultados obtidos podem servir como suporte para futuros trabalhos sobre a variabilidade do vírus da leprose dos citros.



## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, K.; JOHANSEN, I.E. A single conserved amino acid in the coat protein gene of Pea seed-born mosaic *potyvirus* modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. **Virology**, San Diego, v. 241, p. 304-311, 1998.
- ACOSTA-LEAL, R.; BRYAN, K. B.; RUSH, C.M. Host effect on the genetic diversification of *Beet necrotic yellow vein virus* single-plant populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, p. 1204-1212, 2010.
- ACOSTA-LEAL, R.; DUFFY, S.; XIONG, Z.; HAMMOND, R.W.; ELENA, S.F. Advances in Plant Virus Evolution: Translating Evolutionary Insights into Better Disease Management. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n. 10, p. 1136-1148, 2011.
- ALI, A.; ROOSSINCK, M.J. Genetic bottlenecks during systemic movement of Cucumber mosaic virus vary in different host plants. **Virology**, San Diego, v. 404, p. 279–283, 2010.
- ARRIVABEM, F.; RODRIGUES, V.; FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; NOVELLI, V.M.; NAKAGAWA, E.K.; MACHADO, M.A. Transmissão diferencial do vírus da leprose dos citros por populações de *Brevipalpus phoenicis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, p. 64, 2005.
- ARRIVABEM, F.; FREITAS-ASTÚA, J.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Avaliação da transmissão do vírus da leprose dos citros por populações de *Brevipalpus phoenicis* provenientes de diferentes plantas hospedeiras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, supl., p.80, 2007.
- BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.;YAMAMOTO, P.T. Adeus à leprose. **Revista Cultivar – Hortaliças de Frutas**, Pelotas, v.10, p. 6-8, 2002.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ARRIVABEM, F.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Resposta do tangor 'Murcott' à inoculação do vírus da leprose-doscitros a campo e em casa de vegetação. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, p.337-348, 2004.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 32, p. 211-220, 2006.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; SEGATTI, N.; NOVELLI, V.M.; RODRIGUES, V.; MEDINA, C.L.; MACHADO, M.A. Response of mandarin cultivars and hybrids to Citrus leprosis virus. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.90, p.305-310, 2008.
- 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.
- BITTANCOURT, A.A. A transmissão da leprose dos citros as folhas e frutas. **O Biológico**, São Paulo, v.22, p. 107-117, 1956.

BOARETTO, M.A.C. Transmissão da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, 1939 (Acari: Tenuipalpidae) temporariamente mantidos em hospedeiros intermediários, em condições laboratoriais. **Científica**, Jaboticabal, v. 22, p.81-93, 1994.

BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Family *Geminiviridae*. In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J. San Diego: Elsevier, 2012, p. 351-373.

CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; MACHADO, M.A. In situ immunocytochemistry of citrus leaves infected with Citrus leprosis virus cytoplasmic type In: XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.33, p.288, 2008.

CARRASCO, P.; DE LA IGLESIA, F.; ELENA, S.F. Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in tobacco etch virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 12979-12984, 2007.

CARSTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 155, p. 133-146, 2010.

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

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

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.

COX, B.A.; JONES, R.A.C. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus X and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groupings. **Archives of Virology**, Wien, v. 155, p.1349–1356, 2010.

CUNHA JUNIOR, J.O.; POZZER, L.; BRIOSO, P.S.T. Variabilidade biológica de isolados do citrus leprosis virus (CiLV) oriundos de cultivares de laranja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p. 294-296, 2007.

DOLJA, V.V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MOTGOMERY, A.E.; VANDEBOSCH, K.A.; CARRINGTON, J.C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long movement of *Tobacco etch potyvirus*. **Virology**, San Diego, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DOMINGO-CALAP, P.; CUEVAS, J. M.; SANJUÁN, R. The fitness effects of random mutations in single-stranded DNA and RNA bacteriophages. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, p. 1-7, 2009.

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

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

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p.13910-13913, 1999.

D'URSO, F.; SAMBADE, A.; MOYA, A.; GUERRI, J. & MORENO, P. Variation of haplotype distributions of two genomic regions of Citrus tristeza virus populations from Eastern Spain. **Molecular Ecology**, Malden, v.12, p.517-526, 2003.

DUFFY, S.; TURNER, P. E.; BURCH, C.L. Pleiotropic costs of nicheexpansion in the RNA bacteriophage Phi 6. **Genetics**, Bethesda, v. 172, p. 751-757, 2006.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature**, London, v. 9, p. 267-276, 2008.

DUFFY, S.; MONJANE, A. L.; SHEPHERD, D. N.; WINDRAM, O. P.; OWOR, B. E.; DONALDSON, L.; VAN ANTWERPEN, T.; SAYED, R. A.; FLETT, B.; RAMUSI, M.; RYBICKI, E. P.; PETERSCHMITT, M.; VARSANI, A. Dating the origins of the maize-adapted strain of Maize streak virus, MSV-A. **Journal of General Virology**, Berkshire, v. 90, p. 3066–3074, 2009.

FARGETTE, D.; PINEL, A.; ABUBAKAR, Z.; TRAORÉ, O.; BRUGIDOU, C.; FATOGOMA, S.; HÉBRARD, E.; CHOISY, M.; SÉRÉ, Y.; FAUQUET, C.; KONATÉ, G. Inferring the evolutionary history of Rice yellow mottle virus from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. **Journal of Virology**, Berkshire, 78, p. 3252-3261, 2004.

FERRER, R.M.; FERRIOL, I.; MORENO, P.; GUERRI, J.; RUBIO, L. Genetic variation and evolutionary analysis of broad bean wilt virus 2. **Archives of Virology**, Wien, v.156, p.1445–1450, 2011.

FERRIS, M.T.; JOYCE, P.; BURCH, C.L. High frequency of mutations that expand the host range of an RNA virus. **Genetics**, Bethesda, v. 176, p.1013-1022, 2007.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 262-263.

FLECHTMANN, C.H.W. **Elementos de Acarologia**. São Paulo: Livraria Nobel, 1975. p.28-34.

FREITAS-ASTÚA, J.; FADEL, A.L.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Resposta diferencial de espécies e de híbridos de citros à leprose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.809-814, 2008.

FREITAS-ASTÚA, J. **Biology, background, diagnostic and worldwide situation of leprosis and its vector**. **Annals of the International Workshop on citrus quarantine pests**. Villahermosa, Mexico, 2009. CD-ROM.

FRENCH, R.; STENGER, D.C. Population structure within lineages of Wheat streak mosaic virus derived from a common founding event exhibits stochastic variation inconsistent with the deterministic quasispecies model. **Virology**, San Diego, v. 343, p. 179-189, 2005.

- GARCÍA-ARENAL, F; FRAILE, A; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.157-186, 2001.
- GARCÍA-ARENAL, F; FRAILE, A; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, Barcelona, v.6, p.225-232, 2003.
- GLASA, M.; BANANEJ, K.; PREDAJŇA, L.; VAHDAT, A. Genetic diversity of *Watermelon mosaic virus* in Slovakia and Iran shows distinct pattern. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, 38-42 p., 2011.
- GÓMEZ, E.C.; VARGAS, M.R.; RIVADAMEIRA, C.; LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; ASTUA-MONGE, G.; RODRIGUES, J.C.V.; MESA COBO, N.C.; KITAJIMA, E.W. First report of the *Citrus leprosis virus* on citrus in Santa Cruz, Bolivia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p 686, 2005.
- 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.
- HANSSEN, I.M.; LAPIDOT, M.; THOMMA, B.P.H.J. Emerging viral diseases of tomato crops. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, p. 539-548, 2010.
- HARKINS, G.W.; MARTIN, D.P.; DUFFY, S.; MONJANE, A.L.; SHEPHERD, D.N.; WINDRAM, O.P.; OWOR, B.E.; DONALDSON, L.; VAN ANTWERPEN, T.; SAYED, R.A.; FLETT, B.; RAMUSI, M.; RYBICKI, E.P.; PETERSCHMITT, M.; VARSANI, A. Dating the origins of the maize-adapted strain of Maize streak virus, MSV-A. **Journal of General Virology**, Berkshire, v. 90, p. 3066–3074, 2009.
- HOLLAND, J.J.; SPINDLER, K.; HORODYSKI, F.; GRABAU, E.; NICHOL, S.; VANDEPOL, S. Rapid Evolution of RNA genomes. **Science**, Washington, v.215, p.1577-1582, 1982.
- IZQUIERDO C., I.; ZERMEÑO D., L.F.; MENDEZ, W.; OTERO-COLINA, G.; FREITAS-ASTUA, J.; LOCALI-FABRIS, E.C.; MORAES, J.G.; CALEGARIO, R.F.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Confirmation of the presence of the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) in Southern Mexico. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 36, p. 395-398, 2011.
- JANSSEN, D.; VELASCO, L.; MARTIN, G.; SEGUNDO, E.; CUADRADO, I.M. Low genetic diversity among *cucumber vein yellowing virus* isolates from Spain. **Virus Genes**, Dordrecht, v. 34, p. 367–371, 2007.
- JIU, M., ZHOU, X.-P., LIU, S. Acquisition and transmission of two begomoviruses by the B and a non-B biotype of *Bemisia tabaci* from Zhejiang, China. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 154, p. 587–591, 2006.
- KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J. Manchas cloróticas em *Clerodendron x speciosum* e mancha anular em *Solanum violaefolium* associados a efeitos citopáticos similares aos dos vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, p.133-134, 2000.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HAKAKAVA, 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.

KOENIG, R; LÜDDECKE, P; HAEBERLÉ, A.M. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformational polymorphism of immunocapture RT-PCR products. **Journal of General Virology**, Berkshire, v.76, p.2051-2055, 1995.

KONG, P.; RUBIO, L.; POLEK, M.; FALK B.W. Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. **Virus Genes**, Dordrecht, v.21, p.139-145, 2000.

KUBO, K.S. **Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” – OFV)**. 2006. 102p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

KUBO, K.S.; STUART, R.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI-FABRIS, E.C.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Evaluation of the genetic variability of orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the nucleocapsid gene. **Archives of Virology**, Wien, v.154, p.1009-1014, 2009.

KUBO, K.S.; ARENA, G.D. ; KITAJIMA, E.W. ; MACHADO, M.A. ; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of Citrus leprosis virus C (CiLV-C) to *Arabidopsis thaliana* by *Brevipalpus phoenicis* mites.. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGISTS,18., 2010, Campinas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, p. 85-85, 2010.

KUBO K.S.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht,, v. 54, p. 33-39, 2011.

LEON M., G.A.; REALPE, C.E.; GARZON, P.A.; RODRIGUEZ, J.A.; MORENO P.M.G.; CHILDERS, C.C.; ACHOR, D.; FREITAS-ASTUA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; SALAROLI, R.B.; MESA-COBO., N.C.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 682, 2006.

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.

LI, H.Y.; ROOSSINCK, M.J. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, p.10582-10587, 2004.

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.; 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.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Membro-tipo de um novo gênero de vírus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 16, p. 185-206, 2008.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Genus Cilevirus. In: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: KING, A.M.Q., ADAMS, M.J., CARSTENS, E.B., LEFKOWITZ, E.J. San Diego: Elsevier, 2012, p. 1169-1172.

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.

MOYA, A.; HOLMES, E.C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 279-288, 2004.

NUNES, M.A. **Transmissão do vírus da leprose dos citros por *B. phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) para plantas associadas a pomares cítricos**. 2007, 68p. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

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, (aceito para publicação: doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0538>) 2012a.

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

OCHOA, R.; MINEIRO, J.L.C.A.; MATIOLI, L.; BEARD, J.J.G.; MORAES, J.; BAUCHAN, G.; SATO, M.E. *Brevipalpus phoenicis* NO BRASIL. QUEM É? In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 3., Campinas. **Anais...** Campinas, São Paulo, 2011. CD ROM

OKANO, Y.; MAEJIMA, K.; SHIRAISHI, T.; HASHIMOTO, M.; SENSHU, H.; OZEKI, J.; TAKAHASHI, S.; KOMATSU, K.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Genetic heterogeneity found in the replicase gene of poinsettia mosaic virus isolates. **Archives of Virology**, Wien, v. 155, p. 1367–1370, 2010.

OLIVEIRA, C.A.L. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 7, p. 1-31, 1986.

OHSHIMA, K.; AKAISHI, S.; KAJIYAMA, H.; KOGA, R.; GIBBS, A.J. Evolutionary trajectory of Turnip mosaic virus populations adapting to a new host. **Journal of General Virology**, Berkshire, v. 91, p. 788-801, 2010.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, San Diego, v. 265. p. 218-225, 1999.

PALACIO, A.; DURAN-VILA, N. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. **Journal of Virology Methods**, Maryland Heights, v.77, p.27-36, 1999.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASUMPÇÃO, 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.
- PITA, J.S.; DE MIRANDA, J.R.; SCHNEIDER, W.L.; ROOSSINCK, M.J. Environment determines fidelity for an RNA virus replicase. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 9072–9077, 2007.
- POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p.1358-1369, 1997.
- PRINS, M.; LAIMER, M.; NORIS, E.; SCHUBERT, J.; WASSENEGGER, M.; TEPFER, M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 9, p. 73–83, 2009.
- RANGEL, E.; KITAJIMA, E.W.; CERMELLI, M.; CENTENO, F. Recentes avances en el estudio de la leprosis de los cítricos en Venezuela. In: DEL VALLE et al. (Ed.) **Memorias VII Congreso Nacional de Frutales**. San Cristóbal: Universidad Nacional Experimental Tachira, 2000. p.154.
- RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W. Transmission of Citrus leprosis virus by *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 49., 2000. **Proceedings...**v. 14, Orlando: IOCV, 2000a. p. 174-178.
- RODRIGUES, J.C.V. **Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros**. 2000. 250p. Tese( Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear Na Agricultura , Piracicaba, 2000b.
- 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 violaeifolium*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p.911, 2005.
- RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.; FADEL, A.; NICOLINI, F.; NOVELLI, V.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 28, p. 29-38, 2007.
- ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.L. **Emerging plant viruses**: A diversity of mechanisms and opportunities. In: ROOSSINCK, M.J. **Plant Virus Evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 2008. chap.3. p.27-51
- ROOSINCK, M.J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.191-209, 1997.
- RUBIO, L.; ABOU-JAWDAH, Y.; LIN, H.X.; FALK, B.W. Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. **Journal of General Virology**, Berkshire, v.82, p.929-933, 2001.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜELLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, Malden, v.51, n.3, p.257-265, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, J.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, p. 1970-1989.

SANJUÁN, R.; MOYA, A.; ELENA, S. F. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, p. 8396-8401, 2004.

SCHNEIDER, W.L.; ROOSSINCK, M.J. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. **Journal of Virology**, Washington, v.75, p. 6566–6571, 2001.

SHI, N.; CHEN, J.; WILSON, T.M.A.; MACFARLANE, S.A.; ANTONIW, J.F.; ADAMS, M.J. Single-strand conformation polymorphism analysis of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. **Virus Research**, Amsterdam, v.44, p.1-9, 1996.

SIMMONS, A.M.; LING, K.S.; HARRISON, H.F.; JACKSON, D.M. *Sweet potato leaf curl virus*: efficiency of acquisition, retention and transmission by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection**, Oxon, v. 28, p.1007–1011, 2009.

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

STRAUSS, J.H.; STRAUSS E.G. Evolution of RNA virus. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 42, p. 657-683, 1988.

SWITZER, W. M.; SALEMI, M.; SHANMUGAM, V.; GAO, F.; CONG, M.; KUIKEN, C.; BHULLAR, V.; BEER, B. E.; VALLET, D.; GAUTIER-HION, A.; TOOZE, Z.; VILLINGER, F.; HOLMES, E. C.; HENEINE, W. Ancient co-speciation of simian foamy viruses and primates. **Nature**, London, v. 434, p. 376–380, 2005.

TOMIMURA, K.; SPAK, J.; KATIS, N.; JENNER, C. E.; WALSH, J. A.; GIBBS, A. J.; OHSHIMA, K. Comparisons of the genetic structure of populations of Turnip mosaic virus in West and East Eurasia. **Virology**, San Diego, v. 330, p. 408-423, 2004.

TORRES, R.; LARENAS, J.; FRIBOURG, C.; ROMERO, J. Pepper necrotic spot virus, a new tospovirus infecting solanaceous crops in Peru. **Archives of Virology**, Wien, v. 157, p.609–615, 2012.

VALVERDE, R.A.; SIM, J.; LOTRAKUL, P. Whitefly transmission of *Sweet potato viruses*. **Virus Research**, Amsterdam, v.100, p. 123–128, 2004.

VERGANI, A.R. Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo. Ministerio de Agricultura de la Nación. Buenos Aires: Instituto Sanidad Vegetal, 1945. Serie A.5, p.1-11.

WELBOURNE, W.C.; OCHOA, R.; KANE, E.C.; ERBE, E.F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 30, n. 1/3, p.107-133, 2003.

WYLIE, S.J.; COUTTS, B.A.; JONES, R.A.C. Genetic variability of the coat protein sequence of pea seed-borne mosaic virus isolates and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groups. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, p.1287–1290, 2011a.

WYLIE, S.J.; JONES, M.G.K. Characterisation and quantitation of mutant and wild-type genomes of Hardenbergia mosaic virus isolates co-infecting a wild plant of *Hardenbergia comptoniana*. **Archives of Virology**, San Diego, v. 156, p. 1251–1255, 2011b.

ZHANG, S.C.; LING, K.S. Genetic diversity of sweet potato begomoviruses in the United States and identification of a natural recombinant between sweet potato leaf curl virus and sweet potato leaf curl Georgia virus. **Archives of Virology**, Wien, v. 156, p. 955–968, 2011.



**ANEXOS**



## ANEXO A - Alinhamento das sequências da *p29* depositadas no GenBank e sinalização de primers desenhados

```

DQ157466.1      -GCGATAGATATCCGGTGGCTGTTGACCCTGCTGAGGTCTTTAGAGTCGTATGCTCTATA 59
DQ352194.1      TCGATAGATATCCTGTGGCTGTTGACCCTGCTGAGGTCTTTAGAGTCGTATGCTCTATA 60
DQ388512.1      -GCGATAGATATCCTGTGGCTGTTGACCCGCTGAGGTCTTTAGAGTCGTATGCTCTATA 59
                *****

DQ157466.1      GTCTCAAGTAAGGACGAGTTTAGGTTGCTCTTTGAGGAACCGCTCGCTTGTCTCCCTGAG 119
DQ352194.1      GTCTCAAGTAAGGACGAGTTTAGGTTGCTCTTTGAGGAACCGCTCGCTTGTCTCCCTGAG 120
DQ388512.1      GTCTCAAGTAAGGACGAGTTTAGGTTGCTCTTTGAGGAACCGCTCGCTTGTCTCCCTGAG 119
                *****

DQ157466.1      GGTAATTTGCTTCCTGTCATTAATTAAGTAATACTGACTTTTATGATACTATTATTGAT 179
DQ352194.1      GGTAATTTGCTTCCTGTCATTAATTAAGTAATACTGACTTTTATGATACTATTATTGAT 180
DQ388512.1      GGTAATTTGCTTCCTGTCATTAATTAAGTAATACTGACTTTTATGATACTATTATTGAT 179
                *****

DQ157466.1      ATTTT-ACCGCGAATTTGATTTTGTCAATTATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGAC 238
DQ352194.1      ATTTT-ACCGCGAATTTGATTTTGTCAATTATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGAC 239
DQ388512.1      ATTTTACCGCGAATTTGATTTTGTCAATTATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGAC 239
                *****

DQ157466.1      CCTTCCTCTGCTTTGATTGCTGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAATGTGTCTGTT 298
DQ352194.1      CCTTCCTCTGCTTTGATTGCTGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTT 299
DQ388512.1      CCTTCCTCTGCTTTGATTGCTGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTT 299
                *****

DQ157466.1      CCTGAAGGTCTGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCTCAA 358
DQ352194.1      CCTGAAGGTCTGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCTCAA 359
DQ388512.1      CCTGAAGGTCTGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCTCAA 359
                *****

DQ157466.1      CAACTGTCACGAGCGTCAGCGGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTAGTGGTTATCAG 418
DQ352194.1      CAACTGTCACGAGCGTCAGCGGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTAGTGGTTATCAG 419
DQ388512.1      CAACTGTCACGAGCGTCAGCGGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTAGTGGTTATCAG 419
                *****

DQ157466.1      GCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGTAAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTCGCT 478
DQ352194.1      GCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGTAAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTCGCT 479
DQ388512.1      GCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGTAAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTCGCT 479
                *****

DQ157466.1      CCACCCATAAATAAGAAAGCGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCA 538
DQ352194.1      CCACCCATAAATAAGAAAGCGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCA 539
DQ388512.1      CCACCCATAAATAAGAAAGCGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCA 539
                *****

DQ157466.1      AAGTATGCCGAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCC 598
DQ352194.1      AAATATGCCGAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCC 599
DQ388512.1      AAATATGCCGAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCC 599
                ** *****

DQ157466.1      GAGCCCTATGCATTACCTGATTTTAAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTTGCCGTC 658
DQ352194.1      GAGCCCTATGCATTACCTGATTTTAAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTTGCCGTC 659
DQ388512.1      GAGCCCTATGCATTACCTGATTTTAAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTTGCCGTC 659
                *****

DQ157466.1      AGTGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAG 718
DQ352194.1      AGTGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAG 719
DQ388512.1      A-TGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAG 718
                * *****

DQ157466.1      CGACCCATAAAGAAGCTTGTCCCGGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTTC 778

```

```

DQ352194.1      CGACCCATAAAGAACGTTGTCCCGGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTTC 779
DQ388512.1      CGACCCATAAAGAACGTTGTCCCGGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTTC 778
*****

DQ157466.1      TTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGATTAT 838
DQ352194.1      TTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTAT 839
DQ388512.1      TTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTAT 838
*****

DQ157466.1      GCAGAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAA 898
DQ352194.1      GCAGAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAA 899
DQ388512.1      GCAGAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAA 898
*****

DQ157466.1      CTGGGCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAAGATGTC 958
DQ352194.1      CTGGGCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAAGATGTC 959
DQ388512.1      CTGGGCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAAGATGTC 958
*****

DQ157466.1      GTCGTGTCTGATGAGGAGGATGACTCCGACTCAGCGCAGTAGGTCGGTGGATTAATGATG 1018
DQ352194.1      GTCGTGTCTGATGAGGAGGATGACTCCGACTCAGCGCAGTAGGTCGGTGGATTAATGATG 1019
DQ388512.1      GTCGTGTCTGATGAGGAGGACGACTCCGACTCAGCGCAGTAGGTCGGTGGATTAACGATG 1018
*****

DQ157466.1      GGGGTTTTCTTGCGGTTCTTTCCCTCATTCTATTTTGAATCGCTAATCTCTGGTACTTTT 1078
DQ352194.1      GGGGTTTTCTTGCGGTTCTTTCCCTCATTCTATTTTGAATCGCTAATCTCTGGTACTTTT 1079
DQ388512.1      GGGGTTTTCTTGCGGTTCTTTCCCTCATTCTATTTTGAATCGCTAATCTCTGGTACTTTT 1078
*****

DQ157466.1      TGTGCTGGAGATTATCTGAACCTTACGTTCCGGTCCGGTCGTTGTCAGCTGGGCGAGGTTTG 1138
DQ352194.1      TGTGCTGGAGATTATCTGAACCTTACGTTCCGGTCCGGTCGTTGTCAGCTGGGCGAGGTTTG 1139
DQ388512.1      TGTGCTGGAGATTATCTGAACCTTACGTTCCGGTCCGGTCGTTGTCAGCTGGGCGAGGTTTA 1138
*****

DQ157466.1      AATTCCTCAATTTTGATTAATTTCTAGTCTCTTCCAGCTGGTGGCGTACCACCTTTTCTT 1198
DQ352194.1      AATTCCTCAATTTTGATTAATTTCTAGTCTCTTCCAGCTGGTGGTGTACCACCTTTTCTT 1199
DQ388512.1      AATTCCTCAATTTTGATTAATTTCTAGTCTCTTCCAGCTGGTGGCGTACCACCTTTTCTT 1198
*****

DQ157466.1      TTTAATTTTCTTTTCTTTTGTCTTTATGACA----- 1230
DQ352194.1      TTTAATTTTCTTTTCTTTTGTCTTTA-GACAAAAAAAAAAAAAAAAA 1245
DQ388512.1      TTTAATTTTCTTTTCTTTTGTCTTTATGAC----- 1229
*** * *****

```

Primers 1, Primers 2, Primers 3 e Primers 4

Anexo B - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras vegetais inoculadas com isolado do CiLV-C de SJRP. Na seqüência horizontal, as amostras são: laranja de São José do Rio Preto (fonte de inóculo original), tangerina Cleópatra, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangor Ortanique, tangerina Vermelha, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangerina Vermelha, e seqüências da p29 depositadas no GenBank. Em destaque estão as alterações em nucleotídeos

```
Tangerina_vermelha      ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
Tangerina_vermelha_Pera ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
Cleopatra              ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
Ortanique_Pera        ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
Cleopatra_Pera        ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
Ortanique              ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
SJRP                   ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
DQ352194.1            ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
DQ388512.1            ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
DQ157466.1            ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGACTGACCCTTCTTCTGCTTTGATTGC 50
*****
```

```
Tangerina_vermelha      TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Tangerina_vermelha_Pera TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Cleopatra              TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Ortanique_Pera        TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Cleopatra_Pera        TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Ortanique              TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
SJRP                   TGAGATTATGCAGGCTATAGAGCGACACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
DQ352194.1            TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACCGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
DQ388512.1            TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACCGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
DQ157466.1            TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAATGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
*****
```

```
Tangerina_vermelha      TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
Tangerina_vermelha_Pera TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
Cleopatra              TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
Ortanique_Pera        TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
Cleopatra_Pera        TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
Ortanique              TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
SJRP                   TGCGTAACCTTTAGTAAACCGGATAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCACAA 150
DQ352194.1            TGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCCTCAA 150
DQ388512.1            TGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCCTCAA 150
DQ157466.1            TGCGTGATATTAGCAAGCCTACTAAGAAGAAGCAGCAGTCGCAACCCTCAA 150
*****
```

```
Tangerina_vermelha      CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
Tangerina_vermelha_Pera CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
Cleopatra              CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
Ortanique_Pera        CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
Cleopatra_Pera        CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
Ortanique              CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
SJRP                   CAGCCATCAGGAGCGTCAGCACGTTCTCAACAACCTGCAACCTAGTACTAG 200
DQ352194.1            CAACTGTCAGGAGCGTCAGCGCGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTTAG 200
DQ388512.1            CAACTGTCAGGAGCGTCAGCGCGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTTAG 200
DQ157466.1            CAACTGTCAGGAGCGTCAGCGCGCCCTCAGCAACTGCAACCCGGTCTTAG 200
*****
```

```
Tangerina_vermelha      TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
Tangerina_vermelha_Pera TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
Cleopatra              TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
Ortanique_Pera        TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
Cleopatra_Pera        TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
Ortanique              TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
SJRP                   TGGTTATCAGGCTAAAAGCCTGGTAAACAAAAGGTCGAGGTTGTCCCGC 250
DQ352194.1            TGGTTATCAGGCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGT----- 245
DQ388512.1            TGGTTATCAGGCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGT----- 245
DQ157466.1            TGGTTATCAGGCCAAGAAACCTGCTAAGCAGAAGGCCGAGGTTGT----- 245
*****
```

Tangerina\_vermelha AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
Tangerina\_vermelha\_Pera AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
Cleopatra AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
Ortanique\_Pera AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
Cleopatra\_Pera AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
Ortanique AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
SJRP AAAAGCTGAAGCAGAAGCAGCCTGCTGCACCCATAAAATAAGAAGGCGGCA 300  
DQ352194.1 -AAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTTGCTCCACCCATAAAATAAGAAAGCGGCG 294  
DQ388512.1 -AAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTTGCTCCACCCATAAAATAAGAAAGCGGCG 294  
DQ157466.1 -AAAGCCGAAGCAGAAGCAGCTTGCTCCACCCATAAAATAAGAAAGCGGCG 294  
\*\*\*\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
Tangerina\_vermelha\_Pera AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
Cleopatra AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
Ortanique\_Pera AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
Cleopatra\_Pera AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
Ortanique AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
SJRP AAAGCCAAACTCTATGGATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCTGAAGC 350  
DQ352194.1 AAAGCCAAACTTTATGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAATATGCCGAGGC 344  
DQ388512.1 AAAGCCAAACTTTATGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAATATGCCGAGGC 344  
DQ157466.1 AAAGCCAAACTTTATGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAATATGCCGAGGC 344  
\*\*\*\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
Tangerina\_vermelha\_Pera GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
Cleopatra GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
Ortanique\_Pera GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
Cleopatra\_Pera GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
Ortanique GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
SJRP GAAAGGGCTTCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATCCGAAC 400  
DQ352194.1 GAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCCGAGC 394  
DQ388512.1 GAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCCGAGC 394  
DQ157466.1 GAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATCCGAGC 394  
\*\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha CCTATGCACTGCCTGATTTGAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
Tangerina\_vermelha\_Pera CCTATGCACTGCCTGATTTGAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
Cleopatra CCTATGCACTGCCTGATTTAAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
Ortanique\_Pera CCTATGCACTGCCTGATTTAAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGACTTTGGTT 450  
Cleopatra\_Pera CCTATGCACTGCCTGATTTAAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
Ortanique CCTATGCACTGCCTGATTTAAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
SJRP CCTATGCACTGCCTGATTTAAGGTGATGGAAGCTTCTGAGGATTTGGTT 450  
DQ352194.1 CCTATGCGTTACCTGATTTAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTT 444  
DQ388512.1 CCTATGCGTTACCTGATTTAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTT 444  
DQ157466.1 CCTATGCACTACCTGATTTAAGGTAATGGAAGCTTCTGAGGACCTAGTT 444  
\*\*\*\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
Tangerina\_vermelha\_Pera GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
Cleopatra GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
Ortanique\_Pera GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
Cleopatra\_Pera GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
Ortanique GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
SJRP GCTGTTAACGAAAAGGATCCCATGGGTACTTTGAGAAGCGTCTGTATAG 500  
DQ352194.1 GCCGTCACTGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAG 494  
DQ388512.1 GCCGTCA-TGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAG 493  
DQ157466.1 GCCGTCACTGAGAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGCGCTTATATAG 494  
\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
Tangerina\_vermelha\_Pera CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
Cleopatra CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
Ortanique\_Pera CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
Cleopatra\_Pera CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
Ortanique CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550  
SJRP CATGGGCTTCCCGAAAAGGCCATAAAGAATGTTATCCAGTGTGTTGAGT 550

DQ352194.1 TATGGGCTTCCCGAAGCGACCCATAAAGAACGTTGTCCCGGTATTTCGAGT 544  
 DQ388512.1 TATGGGCTTCCCGAAGCGACCCATAAAGAACGTTGTCCCGGTATTTCGAGT 543  
 DQ157466.1 TATGGGCTTCCCGAAGCGACCCATAAAGAACGTTGTCCCGGTATTTCGAGT 544  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

Tangerina\_vermelha TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 Tangerina\_vermelha\_Pera TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 Cleopatra TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 Ortanique\_Pera TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 Cleopatra\_Pera TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 Ortanique TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 SJRP TCAGTGATCATTTACATTGTAGTGTCTTCCCTGGTCAAAATGCTGAGATA 600  
 DQ352194.1 TCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATA 594  
 DQ388512.1 TCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATA 593  
 DQ157466.1 TCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGAATGCTGAGATA 594  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

Tangerina\_vermelha GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 Tangerina\_vermelha\_Pera GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 Cleopatra GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 Ortanique\_Pera GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 Cleopatra\_Pera GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 Ortanique GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 SJRP GTCAAAACATTCCCTAAGGATTCGGTTGCTGACTATGCCGAAGCACAGCT 650  
 DQ352194.1 GTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCAGAGGCACAAC 644  
 DQ388512.1 GTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCAGAGGCACAAC 643  
 DQ157466.1 GTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCAGAGGCACAAC 644  
 \*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*

Tangerina\_vermelha CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 Tangerina\_vermelha\_Pera CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 Cleopatra CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 Ortanique\_Pera CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 Cleopatra\_Pera CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 Ortanique CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 SJRP CGCCGCATTTACTTGCTGCTAGACAAACAGATTAACCAAATCCATGATTTGG 700  
 DQ352194.1 TGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAACTGG 694  
 DQ388512.1 TGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAACTGG 693  
 DQ157466.1 TGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAATCCACGAACTGG 694  
 \*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*

Tangerina\_vermelha GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 Tangerina\_vermelha\_Pera GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 Cleopatra GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 Ortanique\_Pera GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 Cleopatra\_Pera GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 Ortanique GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 SJRP GTGACATCCTACCTACCAATTATCTTAATGTTCTTGATAGTGGTACACAG 750  
 DQ352194.1 GCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAA 744  
 DQ388512.1 GCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAA 743  
 DQ157466.1 GCGACATCTTACCTACCAATTATCTGAATGTTTTAGATAGTGGTACACAA 744  
 \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

Tangerina\_vermelha GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 Tangerina\_vermelha\_Pera GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 Cleopatra GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 Ortanique\_Pera GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 Cleopatra\_Pera GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 Ortanique GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 SJRP GATGTTGTTGTTTCTGATGGGGATGATGAATCCCAATCAGAGCAGTAA 798  
 DQ352194.1 GATGTCGTCGTGTCTGATGAGGAGGATGACTCCGACTCAGCGCAGTAG 792  
 DQ388512.1 GATGTCGTCGTGTCTGATGAGGAGGATGACTCCGACTCAGCGCAGTAG 791  
 DQ157466.1 GATGTCGTCGTGTCTGATGAGGAGGATGACTCCGACTCAGCGCAGTAG 792  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

ANEXO C - Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras vegetais inoculadas com isolado do CiLV-C de SJRP. Na seqüência horizontal, as amostras são: laranja de São José do Rio Preto (fonte de inóculo original), tangerina Cleópatra, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangerina Cleópatra, tangor Ortanique, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangor Ortanique, tangerina Vermelha, laranja Pera infestada com ácaros provenientes de tangerina Vermelha, e seqüências da p29 depositadas no GenBank. Em destaque estão as alterações em aminoácidos

```

Tangerina_vermelha      MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
Tangerina_vermelha_Pera MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
SJRP                    MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
Cleopatra              MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
Cleopatra_Pera        MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
Ortanique              MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
Ortanique_Pera        MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRNF SKPD KKKQQSQPQ 50
DQ157466.1            MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRDISKPTKKKQQSQPQ 50
DQ352194.1            MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRDISKPTKKKQQSQPQ 50
DQ388512.1            MSIVTFTLTDPSSALIAEIMQAIERHNVSVEGLRDISKPTKKKQQSQPQ 50
*****:.* ** *****

Tangerina_vermelha      QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
Tangerina_vermelha_Pera QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
SJRP                    QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
Cleopatra              QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
Cleopatra_Pera        QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
Ortanique              QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
Ortanique_Pera        QPSRASARSQQLQPSTSGYQAKKPGKQKVEVVPQKQKQPAAPINKKAA 100
DQ157466.1            QLSRASARPQQLQPGPSGYQAKKPAKQKAEV--KPKQQLAPPINKKAA 98
DQ352194.1            QLSRASARPQQLQPGPSGYQAKKPAKQKAEV--KPKQQLAPPINKKAA 98
DQ388512.1            QLSRASARPQQLQPGPSGYQAKKPAKQKAEV--KPKQQLAPPINKKAA 98
* *****.* *****.* **.* ** * **** *.*****

Tangerina_vermelha      KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDCEVMEASEDLV 150
Tangerina_vermelha_Pera KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPECEVMEASEDLV 150
SJRP                    KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 150
Cleopatra              KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 150
Cleopatra_Pera        KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 150
Ortanique              KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 150
Ortanique_Pera        KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 150
DQ157466.1            KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 148
DQ352194.1            KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 148
DQ388512.1            KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFKVMASEDLV 148
*****:.* *****

Tangerina_vermelha      AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
Tangerina_vermelha_Pera AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
SJRP                    AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
Cleopatra              AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
Cleopatra_Pera        AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
Ortanique              AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
Ortanique_Pera        AVNEKDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 200
DQ157466.1            AVSEKDPMGSEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 198
DQ352194.1            AVSEKDPMGSEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 198
DQ388512.1            AVSEKDPMGSEKRLYSMGFPKRPIKNVLPVFEFSDHYIVVFFPGSNAEI 198
**.* *****.* *****.* *****.* *****.* *****

Tangerina_vermelha      VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
Tangerina_vermelha_Pera VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
SJRP                    VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
Cleopatra              VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
Cleopatra_Pera        VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
Ortanique              VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250
Ortanique_Pera        VKNIPKDSVADYAEAQLAALLAARQQINQIHD LGDILPTNYLNVLDSTGQ 250

```

```

DQ157466.1      VKNVPKDSVSDYAEQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTQ 248
DQ352194.1      VKNVPKDSVSDYAEQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTQ 248
DQ388512.1      VKNVPKDSVSDYAEQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTQ 248
***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Tangerina_vermelha      DVVVSDDGDESQSEQ 265
Tangerina_vermelha_Pera DVVVSDDGDESQSEQ 265
SJRP                    DVVVSDDGDESQSEQ 265
Cleopatra              DVVVSDDGDESQSEQ 265
Cleopatra_Pera        DVVVSDDGDESQSEQ 265
Ortanique              DVVVSDDGDESQSEQ 265
Ortanique_Pera        DVVVSDDGDESQSEQ 265
DQ157466.1            DVVVSDEEDSDSAQ 263
DQ352194.1            DVVVSDEEDSDSAQ 263
DQ388512.1            DVVVSDEEDSDSAQ 263
***** :*:*: *

```

**ANEXO D - Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos das amostras oriundas de diferentes regiões geográficas. Cada região resultou em um contig, que foi comparado com as sequências da p29 disponíveis no GenBank. Em destaque a alteração de nucleotídeos**

```

Planaltina_DF      ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Goiania_GO         ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Piracicaba_SP     ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Mirandopolis_SP  ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Campinas_SP       ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Argentina          ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Nova_Erechim_SC   ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Brasilia_DF       ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
DQ388512.1        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Nova_Itaberaba_SC ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Manaus_AM         ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Santa_Cruz_da_Conceicao_SP ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Tocantins         ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
DQ352194.1        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Borborema_SP     ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Cordeiropolis_SP ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Ubarama_SP        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Comendador_Gomes_MG ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Rio_Branco_AC     ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Para              ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Londrina_PR       ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Alfenas_MG        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Serra_Negra_SP   ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
DQ157466.1        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
Maringa_PR        ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
SJRP              ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGACTGACCCTTCCTCTGCTTTGATTGC 50
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

```

Planaltina_DF      TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Goiania_GO         TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Piracicaba_SP     TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Mirandopolis_SP  TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Campinas_SP       TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Argentina          TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Nova_Erechim_SC   TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Brasilia_DF       TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
DQ388512.1        TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Nova_Itaberaba_SC TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Manaus_AM         TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Santa_Cruz_da_Conceicao_SP TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100
Tocantins         TGAGATTATGCAGGCCATTGAGCGGCACAACGTGTCTGTTCCCTGAAGGTC 100

```





Nova\_Itaberaba\_SC CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAATATGCC 339  
 Manaus\_AM CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAATATGCC 340  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAATATGCC 339  
 Tocantins CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAATATGCC 340  
 DQ352194.1 CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAATATGCC 339  
 Borborema\_SP CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Cordeiropolis\_SP CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 341  
 Ubarama\_SP CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Comendador\_Gomes\_MG CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Rio Branco\_AC CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Para CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 340  
 Londrina\_PR CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Alfenas\_MG CTGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 341  
 Serra\_Negra\_SP CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 341  
 DQ157466.1 CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 Maringa\_PR CGGCGAAAGCCAAACTTTATGGGTTGGAGCAACACTGCCCAAAGTATGCC 339  
 SJRP CGGCAAAAGCCAAACTCTATGGAATTGGAGCAACACTGCCCTAAGTATGCT 345  
 \* \* \* \* \*

Planaltina\_DF GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Goiania\_GO GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Piracicaba\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 391  
 Mirandopolis\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 390  
 Campinas\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Argentina GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Nova\_Erechim\_SC GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 391  
 Brasilia\_DF GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 390  
 DQ388512.1 GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Nova\_Itaberaba\_SC GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Manaus\_AM GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 390  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Tocantins GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 390  
 DQ352194.1 GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Borborema\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Cordeiropolis\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 391  
 Ubarama\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Comendador\_Gomes\_MG GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Rio Branco\_AC GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Para GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 390  
 Londrina\_PR GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Alfenas\_MG GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 391  
 Serra\_Negra\_SP GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 391  
 DQ157466.1 GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 Maringa\_PR GAGGCGAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTATAAGATATC 389  
 SJRP GAAGCGAAAGGGGCTGCAGAAGCAGATAGGGATGACATATTACAAGATATC 395  
 \* \* \* \* \*

Planaltina\_DF CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Goiania\_GO CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Piracicaba\_SP CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 437  
 Mirandopolis\_SP CGAGCCCTATGCGTTA-CCGGATTTAAGGTAATGGAAGGCTTCTGAAG 440  
 Campinas\_SP CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Argentina CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Nova\_Erechim\_SC CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 437  
 Brasilia\_DF CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 436  
 DQ388512.1 CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Nova\_Itaberaba\_SC CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Manaus\_AM CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 436  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Tocantins CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 436  
 DQ352194.1 CGAGCCCTATGCGTTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Borborema\_SP CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Cordeiropolis\_SP CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 437  
 Ubarama\_SP CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Comendador\_Gomes\_MG CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Rio Branco\_AC CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Para CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 436  
 Londrina\_PR CGAGCCCTATGCAATTA-CCTGATTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435

Alfenas\_MG CGAGCCCTATGCCTA-CCTGATGTGAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 437  
 Serra\_Negra\_SP CGAGCCCTATGCATTA-CCTGATTTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 437  
 DQ157466.1 CGAGCCCTATGCATTA-CCTGATTTTAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 Maringa\_PR CGAGCCCTATGCATTA-CCTGATTTCAAGG-TAATGGAAG-CTTCTGA-G 435  
 SJRP CGAACCCCTATGCCTG-CCTGACTTTTAAGG-TGATGGAAG-CTTCTGA-G 441  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

Planaltina\_DF GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Goiania\_GO GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Piracicaba\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 Mirandópolis\_SP GACCAAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 489  
 Campinas\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Argentina GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Nova\_Erechim\_SC GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 Brasilia\_DF GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-CAAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 DQ388512.1 GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-TGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 483  
 Nova\_Itaberaba\_SC GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Manaus\_AM GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 485  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Tocantins GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 485  
 DQ352194.1 GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Borborema\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Cordeiropolis\_SP GACCAAGTTGCCGTCAGCGCAA-CGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 Ubarama\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Comendador\_Gomes\_MG GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Rio Branco\_AC GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Para GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 Londrina\_PR GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Alfenas\_MG GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 Serra\_Negra\_SP GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 486  
 DQ157466.1 GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAACGACCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 Maringa\_PR GACCTAGTTGCCGTCAGTGA-GAAGGATCCAATGGGTAGCTTTGAGAAGC 484  
 SJRP GATTTGGTTGCTGTTAACGA-AAAGGATCCCATGGGTACTTTTGAAGC 490  
 \*\* \*\* \*

Planaltina\_DF GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCCATAAAGAACGTTGTCCC 534  
 Goiania\_GO GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Piracicaba\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 Mirandópolis\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 538  
 Campinas\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCCATAAAGAACGTTGTCCC 534  
 Argentina GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Nova\_Erechim\_SC GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 Brasilia\_DF GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 DQ388512.1 GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 532  
 Nova\_Itaberaba\_SC GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Manaus\_AM GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 534  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Tocantins GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 534  
 DQ352194.1 GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Borborema\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Cordeiropolis\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 Ubarama\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Comendador\_Gomes\_MG GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Rio Branco\_AC GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Para GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 Londrina\_PR GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Alfenas\_MG GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 Serra\_Negra\_SP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 535  
 DQ157466.1 GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 Maringa\_PR GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 533  
 SJRP GCTTATATAGTATGGGCTTCCCGAAGCGACCC-ATAAAGAACGTTGTCCC 539  
 \*

Planaltina\_DF GGTGTTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 584  
 Goiania\_GO GGTGTTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
 Piracicaba\_SP GGTGTTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
 Mirandópolis\_SP GGTGTTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 588  
 Campinas\_SP GGTGTTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 584

Argentina GGTCTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Nova\_Erechim\_SC GGTCTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
Brasilia\_DF GGTCTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
DQ388512.1 GGTCTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 582  
Nova\_Itaberaba\_SC GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Manaus\_AM GGTCTTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 584  
Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Tocantins GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 584  
DQ352194.1 GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Borborema\_SP GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Cordeiropolis\_SP GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
Ubarama\_SP GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Comendador\_Gomes\_MG GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Rio Branco\_AC GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Para GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
Londrina\_PR GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Alfenas\_MG GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
Serra\_Negra\_SP GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 585  
DQ157466.1 GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
Maringa\_PR GGTATTCGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCGA 583  
SJRP AGTCTTTGAGTTCAGTGATCACTACATTGTGGTGTCTTCCCTGGCTCAA 589  
\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*

Planaltina\_DF ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 634  
Goiania\_GO ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Piracicaba\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
Mirandopolis\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 638  
Campinas\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 634  
Argentina ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Nova\_Erechim\_SC ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
Brasilia\_DF ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
DQ388512.1 ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 632  
Nova\_Itaberaba\_SC ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Manaus\_AM ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 634  
Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Tocantins ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 634  
DQ352194.1 ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Borborema\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Cordeiropolis\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
Ubarama\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Comendador\_Gomes\_MG ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Rio Branco\_AC ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Para ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
Londrina\_PR ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Alfenas\_MG ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
Serra\_Negra\_SP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 635  
DQ157466.1 ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
Maringa\_PR ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCA 633  
SJRP ATGCTGAGATAGTTAAGAACGTTCCCTAAGGACTCCGTTTCTGACTATGCT 639  
\*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*

Planaltina\_DF GAGGCACAACCTTCATGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 684  
Goiania\_GO GAGGCACAACCTTCATGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Piracicaba\_SP GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 685  
Mirandopolis\_SP GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 688  
Campinas\_SP GAGGCACAACCTTCATGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 684  
Argentina GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Nova\_Erechim\_SC GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 685  
Brasilia\_DF GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 685  
DQ388512.1 GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 682  
Nova\_Itaberaba\_SC GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Manaus\_AM GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 684  
Santa\_Cruz\_da\_Conceicao\_SP GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Tocantins GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 684  
DQ352194.1 GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Borborema\_SP GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683  
Cordeiropolis\_SP GAGGCACAACCTTGCTGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 685  
Ubarama\_SP GAGGCACAACCTTCATGCGCTCCTTGCTGCTAGACAGCAGATTAATCAAAT 683



Planaltina_DF	AGCGCAGTAG	794
Goiania_GO	AGCGCAGTAG	792
Piracicaba_SP	AGCGCAGTAG	794
Mirandopolis_SP	AGCGCAGTAG	797
Campinas_SP	AGCGCAGTAG	793
Argentina	AGCGCAGTAG	792
Nova_Erechim_SC	AGCGCAGTAG	794
Brasilia_DF	AGCGCAGTAG	794
DQ388512.1	AGCGCAGTAG	791
Nova_Itaberaba_SC	AGTGCAGTAG	792
Manaus_AM	AGCGCAGTAG	793
Santa_Cruz_da_Conceicao_SP	AGCGCAGTAG	792
Tocantins	AGCGCAGTAG	793
DQ352194.1	AGCGCAGTAG	792
Borborema_SP	AGCGCAGTAG	792
Cordeiropolis_SP	AGCGCAGTAG	794
Ubarama_SP	AGCGCAGTAG	792
Comendador_Gomes_MG	AGCGCAGTAG	792
Rio Branco_AC	AGCGCAGTAG	792
Para	AGCGCAGTAG	794
Londrina_PR	AGCGCAGTAG	792
Alfenas_MG	AGCGCAGTAG	794
Serra_Negra_SP	AGCGCAGTAG	794
DQ157466.1	AGCGCAGTAG	792
Maringa_PR	AGCGCAGTAG	792
SJRP	AGAGCAGTAA	798
	** *****	



Brasilia/DF KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Piracicaba/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Planaltina/DF KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Goiania/GO KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Nova\_Erechim/SC KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Campinas/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Serra\_Negra/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Argentina KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Tocantins KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 ABD59464.1\_Panama KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Rio\_Branco/AC KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Maringa/PR KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Londrina/PR KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Para KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 YP\_654539.1\_Cordeiropolis/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 ABA42876.1\_Campinas/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Manaus/AM KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Nova\_Itaberaba/SC KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 Alfenas/MG KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 147  
 SJRP/SP KAKLYGLEQHCPKYAEAKGLQKQIGMTYYKISEPYALPDFK-VMEASEDL 149  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\* . :\*

Borborema/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Mirandopolis/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 198  
 Ubarama/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Comendador\_Gomes/MG VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Cordeiropolis/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Brasilia/DF VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Piracicaba/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Planaltina/DF VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Goiania/GO VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Nova\_Erechim/SC VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Campinas/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Serra\_Negra/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Argentina VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Tocantins VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 ABD59464.1\_Panama VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Rio\_Branco/AC VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Maringa/PR VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Londrina/PR VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Para VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 YP\_654539.1\_Cordeiropolis/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 ABA42876.1\_Campinas/SP VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Manaus/AM VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Nova\_Itaberaba/SC VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 Alfenas/MG VAVSEKNDPMGSFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 197  
 SJRP/SP VAVSEKNDPMGTFEKRLYSMGFPKRPIKNVVPVFEFSDHYIVVFFPGSNAE 199  
 \*\*..:\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Borborema/SP IVKNVPKDSVDPDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Mirandopolis/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 248  
 Ubarama/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLDALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Comendador\_Gomes/MG IVKNVPKDSVSDYAEAQLHALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Cordeiropolis/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Brasilia/DF IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Piracicaba/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Planaltina/DF IVKNVPKDSVSDYAEAQLHALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Goiania/GO IVKNVPKDSVDPDYAEAQLHALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Nova\_Erechim/SC IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Campinas/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLDALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Serra\_Negra/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Argentina IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao/SP IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Tocantins IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 ABD59464.1\_Panama IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247  
 Rio\_Branco/AC IVKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDST 247

Maringa/PR IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 Londrina/PR IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 Para IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 YP\_654539.1\_Cordeiropolis/SP IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 ABA42876.1\_Campinas/SP IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 Manaus/AM IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 Nova\_Itaberaba/SC IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 Alfenas/MG IVKKNVPKDSVSDYAEAQLAALLAARQQINQIHELGDILPTNYLNVLDSTG 247  
 SJRP/SP IVKNI<sup>I</sup>PKDSV<sup>A</sup>DYAEAQLAALLAARQQINQIH<sup>D</sup>LGDILPTNYLNVLDSTG 249  
 \*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Borborema/SP QDVVV<sup>Y</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Mirandopolis/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 264  
 Ubarama/SP QDVVV<sup>Y</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Comendador\_Gomes/MG QDVVV<sup>Y</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Cordeiropolis/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Brasilia/DF QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Piracicaba/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Planaltina/DF QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Goiania/GO QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Nova\_Erechim/SC QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Campinas/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Serra\_Negra/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Argentina QDVVV<sup>S</sup>DEEDDPDSAQ- 263  
 Santa\_Cruz\_da\_Conceicao/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Tocantins QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 ABD59464.1\_Panama QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Rio\_Branco/AC QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Maringa/PR QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Londrina/PR QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Para QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 YP\_654539.1\_Cordeiropolis/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 ABA42876.1\_Campinas/SP QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 Manaus/AM QD<sup>A</sup>VVSDEEDSDSAQ- 263  
 Nova\_Itaberaba/SC QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDS<sup>V</sup>Q- 263  
 Alfenas/MG QDVVV<sup>S</sup>DEEDSDSAQ- 263  
 SJRP/SP QDVVVSD<sup>G</sup>D<sup>E</sup>S<sup>Q</sup>S<sup>E</sup>Q- 265  
 \*\*. \*\* \* :\*.:\* \*