Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Gama de hospedeiros naturais e experimentais de *Passion fruit green spot virus* e interações com o vetor *Brevipalpus yothersi*

Gleice Rafaela Renunza Pires

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

Piracicaba
2022

Gleice Rafaela Renunza Pires
Engenheira Agrônoma

Gama de hospedeiros naturais e experimentais de *Passion fruit green spot virus* e interações com o vetor *Brevipalpus yothersi*

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2022

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

Pires, Gleice Rafaela Renunza

Gama de hospedeiros naturais e experimentais de *Passion fruit green spot virus* e interações com o vetor *Brevipalpus yothersi* / Gleice Rafaela Renunza Pires. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

139 p.

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

1. Pinta verde do maracujazeiro 2. *Cilevirus* 3. *Kitaviridae* 4. Vírus transmitidos por *Brevipalpus* 5. Leprose dos citros I. Título

Aos meus pais, Maurilio Pires e Maria Augusta Renunza Andriatto (*in memorian*), que sempre apoiaram e incentivaram todos os meus sonhos, me guiaram e inspiraram para chegar até este momento.

Com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela proteção, por ter sido meu conforto nos momentos de angústia e guiar meus passos até aqui.

Aos meus pais, meus maiores exemplos, que sempre me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para proporcionar uma boa educação para suas filhas. Agradeço especialmente ao meu pai, Maurilio Pires, por estar sempre presente e ser meu alicerce. Espero ser merecedora de todo o seu esforço.

À minha irmã, Bruna, por toda ajuda, cuidado e preocupação, por me ouvir e ter me dado meus maiores presentes, Murillo e Kauê.

Aos meus sobrinhos, por todo carinho e preocupação, e principalmente, por serem minha maior alegria, me arrancando sorrisos e me distraindo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, pela oportunidade de ser sua orientada durante esses anos, pela paciência e por todos os ensinamentos.

À Dra. Aline D. Tassi, por todo conhecimento compartilhado, por todo auxílio durante a execução deste trabalho e, em especial, pela amizade construída durante esses anos.

À minha amiga Ana Carolina Botelho, pela amizade, apoio e por ser minha companhia desde o primeiro dia do mestrado. Às pessoas maravilhosas que conheci em Piracicaba, em especial à minha amiga Letícia Delarizza, que me acolheu, amparou e trouxe alegria para os meus dias. À minha amiga Izabella Leite, pelos anos de amizade e por se fazer presente mesmo tão distante. Obrigada por fazerem com que essa caminhada se tornasse mais fácil.

À banca examinadora, por serem exemplos de profissionais e por estarem presentes neste momento tão importante para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que me incentivaram, torceram e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO GERAL 13
1.1 Revisão Bibliográfica 13
1.1.1 Cultivo do maracujá no Brasil 13
1.1.2 Citricultura brasileira 14
1.1.3 Vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB) 15
1.1.4 *Cilevirus* 19
1.1.4.1 *Passion fruit green spot virus* (PfGSV) 21
1.1.4.2 *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) 23
1.1.5 *Brevipalpus yothersi* 27
Referências 29
2 GAMA DE HOSPEDEIROS NATURAIS E EXPERIMENTIAS DE *Passion fruit green spot virus* 37
Resumo 37
Abstract 37
2.1 Introdução 38
2.2 Material e Métodos 39
2.2.1 Colônia de *Brevipalpus* spp. 39
2.2.2 Fontes de inóculo 40
2.2.3 Gama de hospedeiros de PfGSV – transmissão com vetor e infecção natural 40
2.2.4 Gama de hospedeiros de PfGSV – transmissão mecânica 41
2.2.5 Ensaios de RT-PCR 41
2.2.6 Análise citopática dos tecidos sintomáticos 43
2.3 Resultados e Discussão 43
2.4 Conclusão 55
Referências 56
3 DETERMINAÇÃO DE PLANTA INDICADORA PARA ESTUDOS COM *Passion fruit green spot virus* E POSSIBILIDADE DE DETECÇÃO DESTE VÍRUS EM FOLHAS AINDA VERDES DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* 59
Resumo 59

Abstract 59
3.1 Introdução 60
3.2 Material e Métodos 61
3.2.1 Colônia de *Brevipalpus yothersi* 61
3.2.2 Fonte de inóculo 61
3.2.3 Determinação de planta indicadora 62
3.2.4 Detecção de PfGSV em folhas verdes de maracujá-amarelo 63
3.2.5 Ensaios de RT-PCR 64
3.2.6 Detecção de PfGSV nos tecidos das lesões necróticas em *Dolichos lablab* 65
3.2.7 Análise estatística 66
3.3 Resultados e Discussão 66
3.4 Conclusão 71
Referências 71
4 EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE *Passion fruit green spot virus* POR DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Brevipalpus yothersi* 73
Resumo 73
Abstract 73
4.1 Introdução 74
4.2 Material e Métodos 76
4.2.1 Coleta e formação das colônias isolinhas 76
4.2.2 Identificação morfológica das colônias isolinhas 76
4.2.3 Fonte de inóculo 77
4.2.4 Planta teste 77
4.2.5 Eficiência de transmissão de PfGSV 78
4.2.6 Ensaios de RT-PCR 79
4.2.7 Análise estatística 80
4.3 Resultados e Discussão 81
4.4 Conclusão 90
Referências 91
5 POSSIBILIDADE DE CO-TRANSMISSÃO DE *Passion fruit green spot virus* E Citrus leprosis virus C 95
Resumo 95
Abstract 95

5.1 Introdução 96
5.2 Material e Métodos 97
5.2.1 Colônias de *Brevipalpus yothersi* 97
5.2.2 Fontes de inóculo 97
5.2.3 Planta teste 98
5.2.4 Co-transmissão de PfGSV e CiLV-C 98
5.2.5 Eficiência de transmissão de CiLV-C pela isolinha 2 100
5.2.6 Ensaios de RT-PCR 101
5.3 Resultados e Discussão 103
5.4 Conclusão 122
Referências 123
6 DETERMINAÇÃO DOS PERÍODOS DE ACESSO PARA AQUISIÇÃO (PAA) E DE ACESSO À INOCULAÇÃO (PAI) NA RELAÇÃO VÍRUS-VETOR DE *Passion fruit green spot virus*/*Brevipalpus yothersi* 127
Resumo 127
Abstract 127
6.1 Introdução 128
6.2 Material e Métodos 129
6.2.1 Colônia de *Brevipalpus yothersi* 129
6.2.2 Fonte de inóculo 129
6.2.3 Planta teste 130
6.2.4 Período de acesso para a aquisição (PAA) de PfGSV 130
6.2.5 Período de acesso à inoculação (PAI) de PfGSV 131
6.2.6 Ensaios de RT-PCR 131
6.3 Resultados e Discussão 133
6.4 Conclusão 136
Referências 136
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 139

RESUMO

Gama de hospedeiros naturais e experimentais de *Passion fruit green spot virus* e interações com o vetor *Brevipalpus yothersi*

Os vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB) vêm ganhando destaque nos últimos anos devido ao aumento de sua incidência e prejuízos ocasionados, em especial, o citrus leprosis virus C (CiLV-C), agente causal da leprose dos citros, virose de maior importância no Brasil atualmente. Outro VTB com grande potencial para ocasionar graves danos é o recém caracterizado, passion fruit green spot virus (PfGSV), responsável pela pinta verde do maracujazeiro. Ambos os VTBs mencionados pertencem ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* e apresentam como principal característica o surgimento de lesões localizadas em seus hospedeiros, restritas ao ponto de alimentação do vetor, o ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae). O primeiro relato de PfGSV ocorreu em 1997 no estado de São Paulo, quando ocasionou a destruição de pequenos pomares na região do munícipio de Vera Cruz, no entanto, até o momento pouco se sabe sobre este patossistema. O presente trabalho buscou obter maiores informações acerca da interação vírus-vetor para *B. yothersi* e PfGSV, além de estudar a gama de hospedeiros naturais e experimentais deste vírus, o que permitirá que medidas eficientes para o controle da doença possam ser tomadas, além de fornecer dados sobre sua possível origem, evolução e epidemiologia. Avaliou-se a possibilidade de transmissão mecânica de PfGSV, utilizando-se folhas sintomáticas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) e alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) como fontes de inóculo. Foram avaliadas diferentes espécies de plantas, inoculadas com ácaros virulíferos ou mecanicamente, quanto à suscetibilidade ao vírus, além da análise de plantas naturalmente infectadas, visando a determinação da gama de hospedeiros de PfGSV. Procurou-se identificar, após uma triagem com diferentes leguminosas, uma planta indicadora, de fácil produção e rápido crescimento, para estudos futuros com PfGSV. A eficiência de transmissão de PfGSV foi estudada em diferentes populações do ácaro-vetor, bem como a possibilidade de co-transmissão de PfGSV e CiLV-C. Além disso, os períodos de acesso para aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI) para *B. yothersi*/PfGSV foram estabelecidos após diferentes tempos de alimentação do ácaro na fonte de inóculo e na planta indicadora utilizada. A presença dos vírus foi confirmada em todos os experimentos por ensaios de RT-PCR, além da análise dos tecidos sintomáticos em microscópio eletrônico de transmissão. Pode-se verificar que a transmissão mecânica de PfGSV é possível desde que se utilize folhas de maracujá como inóculo. PfGSV apresenta uma vasta gama de hospedeiros naturais e experimentais, tendo sido possível a confirmação de 31 espécies infectadas. Dentre as leguminosas, *Dolichos lablab* L. mostrou-se eficiente para uso como planta indicadora para estudos com este vírus, apresentando lesões locais necróticas nas nervuras cinco dias após a inoculação com ácaros virulíferos. Houve diferenças significativas quanto a transmissão de PfGSV pelas 11 populações de *B. yothersi* analisadas. A possibilidade de co-transmissão entre CiLV-C e PfGSV não foi confirmada, no entanto, uma das colônias isolinhas utilizadas apresentou capacidade de adquirir ambos os vírus.

O PAA e PAI de PfGSV foram determinados como 1 e 12 horas, respectivamente.

Palavras-chave: Pinta verde do maracujazeiro, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, Vírus transmitidos por *Brevipalpus*, Leprose dos citros

ABSTRACT

Range of natural and experimental hosts of *Passion fruit green spot virus* and interactions with the vetor *Brevipalpus yothersi*

The *Brevipalpus*-transmitted viruses (BTV) have been gaining prominence in recent years due increased in their incidence and losses caused, particularly, citrus leprosis virus C (CiLV-C), the causal agent of citrus leprosis, the most important viral disease in citrus in Brazil currently. Another BTV with great potential to cause severe damage is the recently characterized passion fruit green spot virus (PfGSV), responsible for the passion fruit green spot. Both mentioned BTV belong to the genus *Cilevirus*, family *Kitaviridae*, order *Martellivirales* and their main characteristic is the appearance of lesions induced in their hosts, restricted to the feeding point of the vector, the mite *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae).The first report of PfGSV occurred in 1997 in the state of São Paulo, when it caused the destruction of small orchards in the region of the municipality of Vera Cruz, however, until now, little is known about this pathosystem. Thus, the present work sought to obtain more information about the virus-vector interaction for *B. yothersi* and PfGSV, and additionally to study its range of natural and experimental hosts, which will allow efficient strategies to control the disease, and provide data on its possible origin, evolution and epidemiology. The possibility of mechanical transmission of PfGSV was evaluated using symptomatic leaves of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) and privet (*Ligustrum sinense* Lour.) as inoculum sources. Different plant species, inoculated with viruliferous mites or mechanically, were evaluated regarding their susceptibility to the virus, in addition to the analysis of naturally infected plants, to establish of the PfGSV host range. A screening of different legumes was made to find a suitable indicator plant, of easy production and fast growth, for future studies with PfGSV. The transmission efficiency of PfGSV was studied in different populations of the mite-vector, as well as the possibility of co-transmission of PfGSV and CiLV-C. In addition, acquisition access period (AAP) and inoculation access period (IAP) for *B. yothersi*/PfGSV were established after different times of mite feeding on the inoculum source and on the indicator plant used. The presence of viruses was confirmed in all experiments by RT-PCR assays, using specific primers for PfGSV and CiLV-C, in addition to the analysis of symptomatic tissues under a transmission electron microscope. It can be verified mechanical transmission of PfGSV was achieved, as long as passion fruit leaves are used as inoculum. PfGSV has a wide range of hosts, either natural or experimental, with confirmation of 31 infected species. Among the legumes, *Dolichos lablab* L. proved to be efficient for use as an indicator plant for studies with this virus, showing local necrotic lesions on the veins five days after inoculation with viruliferous mites. There were significant differences in the transmission of PfGSV by the 11 populations of *B. yothersi* analyzed. The possibility of co-transmission between CiLV-C and PfGSV was not confirmed, however, one of the isoline colonies used showed the ability to acquire both viruses. The PfGSV AAP and IAP were determined as 1 and 12 hours, respectively.

Keywords: Passion fruit green spot, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, *Brevipalpus*-transmitted viruses, Citrus leprosis

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Cultivo do maracujá no Brasil

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, gênero *Passiflora*. Possui grande diversidade genética natural, apresentando mais de 400 espécies, das quais *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., conhecida popularmente como maracujá-amarelo, é a de maior destaque nos cultivos comerciais. É originário da América do Sul e ganhou a preferência dos pequenos produtores brasileiros, sendo cultivada no Brasil todo, em decorrência da sua rápida produção e alta produtividade, o que proporciona um rápido retorno econômico (BRUCKNER; SANTOS; BORÉM, 2021).

O Brasil é o maior produtor de maracujá do mundo, com produção de 690.364 toneladas em uma área de 46.436 hectares (CAVICHIOLI; CONTIERO; CELESTRINO, 2020; IBGE, 2020). O estado da Bahia é o principal produtor desta fruta no país, com área cultivada de mais de 15.000 ha. Embora seja o maior produtor, a produtividade brasileira da fruta ainda é considerada baixa, 14.1 $t.ha^{-1}$, devido à falta de informações, baixo nível tecnológico e uso de variedades inadequadas. A produção brasileira destina-se ao abastecimento do mercado interno e baseia-se na agricultura familiar. Aproximadamente 60% do total produzido destina-se ao mercado *in natura* e o restante para a agroindústria (CAVICHIOLI; CONTIERO; CELESTRINO, 2020; BRUCKNER; SANTOS; BORÉM, 2021).

A área cultivada com maracujá-amarelo vem aumentando nos últimos anos, no entanto, a ocorrência de pragas e doenças tem limitado esta expansão. Uma das principais doenças que incidem sobre a cultura é a virose conhecida como endurecimento dos frutos do maracujazeiro, ocasionada pelo vírus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), que reduz o desenvolvimento e longevidade das plantas infectadas. Além desta, outras doenças como mancha-bacteriana, podridão do colo e murcha de *Fusarium* são importantes para a cultura (BRUCKNER; SANTOS; BORÉM, 2021). No entanto, doenças consideradas atualmente como de importância secundária para o maracujazeiro merecem atenção, pois podem causar graves prejuízos caso não sejam devidamente controladas, como exemplo, pode-se citar a pinta verde do maracujazeiro, ocasionada pelo cilevirus passion fruit green spot virus

(PfGSV). PfGSV merece atenção pois quando relatado pela primeira vez em 1997, na região de Vera Cruz – São Paulo, ocasionou a destruição de pequenos pomares devido à alta incidência e, possivelmente, por se tratar de isolados mais agressivos do vírus (KITAJIMA et al., 1997).

1.1.2 Citricultura brasileira

As espécies cítricas, que se encontram agrupadas nos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, família Rutaceae, são originárias da Ásia e foram introduzidas no Brasil pelos portugueses durante a colonização do país, e aqui encontraram condições climáticas e de solo muito favoráveis para seu desenvolvimento. Em meados de 1530 os portugueses trouxeram as primeiras sementes de laranja-doce para os estados de São Paulo e Bahia, e a partir de 1930 a citricultura foi implantada de maneira comercial em todo país. O Brasil ocupou a posição de maior produtor de citros durante muitos anos, mas atualmente foi superado pela China e passou a ocupar o segundo lugar neste ranking (SANTOS, 2019; GIRARDI et al., 2021).

Embora introduzidas em 1530, até hoje o cultivo das laranjas-doce predomina na citricultura brasileira, sendo o grupo de frutas cítricas mais produzido no mundo. No entanto, o cultivo de tangerinas e híbridos, limas-ácidas e limões vêm apresentando crescimento significativo nos últimos anos. Como a laranja é a fruta cítrica mais cultivada (262,97 milhões de caixas na safra 2021/2022), vale mencionar que o estado de São Paulo é o maior produtor de laranjas, processador de suco e exportador dessa *commodity* no mundo, sendo responsável por cerca de 80% da produção nacional desta fruta (COVIELO; ANDRADE, 2017; GIRARDI et al., 2021; FUNDECITRUS, 2022).

A citricultura brasileira é responsável pela economia de diversos municípios, em especial daqueles que compõem o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais. Os números gerados por esse setor são expressivos, estimando-se que seja responsável por movimentar cerca de US$ 14 bilhões/ano no país e gerar diversos empregos (GIRARDI et al., 2021).

Novas tecnologias vêm sendo incorporadas ao setor citrícola ano após ano, visando o aumento da produtividade da cultura. No entanto, as plantas estão sujeitas ao ataque de pragas e doenças constantemente. Uma doença

que merece destaque, sendo uma das principais doenças da citricultura brasileira, e a virose de maior importância atualmente no país, é a leprose dos citros. Esta doença, além dos danos diretos ocasionados na produção, é responsável por onerar substancialmente a citricultura com gastos da ordem de 54 milhões de dólares por ano apenas para o controle do ácaro-vetor, sendo este o principal método de controle utilizado para a doença, que representa 5% do total gasto com tratamentos fitossanitários em um pomar em produção (REZENDE; KITAJIMA, 2018; BASSANEZI, 2019; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a; GIRARDI et al., 2021). A importância desta doença se dá principalmente pelo fato de as laranjas-doce serem as frutas cítricas mais cultivadas no país e as mais suscetíveis ao vírus da leprose (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a).

1.1.3 Vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB)

Embora conhecidos desde o início do século XX, quando foi relatada a leprose dos citros na Flórida (FAWCETT, 1911), conhecimentos sobre vírus de plantas transmitidos por ácaros *Brevipalpus* ganharam impulso significativo somente neste último quarto de século (KITAJIMA; NOVELLI; ALBERTI, 2014; DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018), encabeçados pelo vírus da leprose C dos citros (citrus leprosis virus C - CiLV-C), de longe o mais importante economicamente dentre os VTBs (BASTIANEL et al., 2010). Atualmente encontram-se listados onze VTBs, molecularmente caracterizados (Tabela 1), porém apenas nove espécies são reconhecidas pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) até o momento. Além de CiLV-C, os vírus coffee ringspot virus (CoRSV), causador da mancha anular do café, passion fruit green spot virus (PfGSV), agente da pinta verde do maracujazeiro, e orchid fleck virus (OFV), agente etiológico da mancha das orquídeas, são dentre eles, os que têm causado perdas econômicas. O primeiro relato da associação de ácaros *Brevipalpus* com viroses foi feita em 1940 por Frezzi, na Argentina, que reproduziu os sintomas de leprose em laranjeiras, utilizando *Tenuipalpus pseudocuneatus* Blanchard (sinonímia de *B. obovatus* Donnadieu). No Brasil, contudo, Musumeci e Rossetti (1963) identificaram o vetor da leprose dos citros, como *B. phoenicis* Geijskes, enquanto Knorr (1968) menciona que a leprose dos citros da Flórida teria como

vetor *B. californicus* Banks e *B. obovatus.* Mais tarde Chagas (1978) demonstrou que CoRSV era transmitido por *B. phoenicis*. Quando relatado por Kitajima et al. (1997), o vetor do PfGSV foi identificado como *B. phoenicis,* assim como para o vírus da mancha clorótica do *Clerodendrum* (clerodendrum chlorotic spot virus - ClCSV) e da mancha anular de solano violeta (solanum violaefolium ringspot virus – SvRSV) (KITAJIMA et al., 1997; FERREIRA et al., 2007; KITAJIMA et al., 2008; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018).

Tabela 1: Relação dos vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB) e seus respectivos vetores.

Família	Gênero	Espécie - Vírus	Ácaro vetor
Kitaviridae	*Cilevirus*	*Citrus leprosis virus C* - citrus leprosis virus C (CiLV-C)	*B. yothersi* e *B. papayensis*[2]
		Citrus leprosis virus C2 - citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2)	*B. yothersi*
		Passion fruit green spot virus - passion fruit green spot virus (PfGSV)	*B. yothersi*
		Cilevirus oahuense - hibiscus yellow blotch virus (HYBV)	*B. yothersi*
		Solanum violifolium ringspot virus - solanum violifolium ringspot virus (SvRSV) [1]	*B. obovatus*
Rhabdoviridae	*Dichorhavirus*	*Dichorhavirus orchidaceae* - orchid fleck virus (OFV)	*B. californicus*
		Dichorhavirus coffeae - coffee ringspot virus (CoRSV)	*B. papayensis*
		Dichorhavirus clerodendri - clerodendrum chlorotic spot virus (ClCSV)	*B. yothersi*
		Dichorhavirus leprosis - citrus leprosis virus N (CiLV-N)	*B. phoenicis* sensu stricto
		Dichorhavirus citri - citrus chlorotic spot virus (CiCSV)	*B. aff. yothersi*
		Cestrum ringspot virus - cestrum ringspot virus[1]	*B. obovatus*

[1]espécies tentativas
[2]em condições experimentais

São descritas na literatura mais de 300 espécies de *Brevipalpus*, identificadas por algumas poucas características morfológicas externas (CASTRO et al., 2020). A introdução de marcadores moleculares e de outros parâmetros morfológicos sugeriram incongruências nas identificações e indicações de maior diversidade. Assim, uma revisão feita na espécie *B. phoenicis* (BEARD et al., 2015) mostrou que ácaros identificados como tal, poderiam ser desmembrados em pelo menos oito espécies, algumas já descritas e outras, crípticas. Uma reavaliação destas espécies que atuam como vetores de VTB, indicou que *B. yothersi* Baker seria o vetor de CiLV-C, CiLV-C2, PfGSV, ClCSV e CiCSV (citrus chlorotic spot virus) (ROY et al., 2015; RAMOS-GONZALEZ et al., 2017; TASSI et al., 2019; DE LILLO et al., 2021). O vetor do CoRSV foi identificado como *B. papayensis* Baker, que experimentalmente é capaz de transmitir CiLV-C (NUNES et al., 2018; DE LILLO et al., 2021). As demais espécies de VTB e seus respectivos vetores encontram-se descritas na Tabela 1.

Uma das características marcantes entre os VTBs é que a infecção resulta em lesões localizadas em seus hospedeiros (mancha clorótica, anelar, necrótica, pinta verde, etc.), sem se tornarem sistêmicas. Comportamento citopático dos VTBs indicou que eles se dividem em dois grandes grupos, o tipo citoplasmático (VTB-C) e o nuclear (VTB-N) (KITAJIMA et al., 2003a), confirmado por estudos moleculares (DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

Os VTB-C apresentam algumas semelhanças com os rhabdovirus, e a princípio foram considerados possíveis membros da família *Rhabdoviridae*. No entanto, após o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C, pode-se observar diferenças estruturais, organizacionais e nas sequências de aminoácidos e nucleotídeos (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Com isso, um novo gênero foi criado para agrupar estes vírus, o *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS FREITAS-ASTÚA; MACHADO, 2012). Os VTBs do tipo citoplasmático, são representados pelo CiLV-C, e têm genoma constituído por duas moléculas (bissegmentado – 5 e 9 kb) de RNA de fita simples (ssRNA) e senso positivo, com vírions dotados de membrana, sendo pertencentes ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* (LOCALI-FABRIS; FREITAS-ASTÚA; MACHADO, 2012; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). O tipo nuclear tem também como genoma ssRNA bissegmentado (2 x 6 kb), mas de senso negativo, apresentando partículas

não envelopadas, e sua organização genômica o inclui em um novo gênero, o *Dichorhavirus,* família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*, e tem como espécie-tipo o OFV, que apresenta *B. californicus* como vetor (DIETZGEN et al., 2014; AFONSO et al., 2016; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017).

Os VTBs apresentam distribuição restrita ao continente Americano, com exceção de OFV que se encontra distribuído mundialmente. Esta distribuição restrita às Américas sugere que este continente seja o centro de origem destes vírus (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Cook et al. (2019) relataram sintomas semelhantes aos da leprose dos citros na África do Sul, tendo como agente causal um isolado de OFV, o que levanta preocupações com a disseminação desta doença para novos continentes. No entanto, parece provável que outros casos venham a ser relatados, uma vez que ácaros *Brevipalpus* têm distribuição global.

Apesar da crescente importância dos VTBs para a agricultura brasileira e dos avanços significativos obtidos até então, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Dentre elas, quais fatores determinam a transmissão de um dado VTB por uma dada espécie de *Brevipalpus*, *B. yothersi* por exemplo, tem a peculiaridade de transmitir tanto cilevirus (CiLV-C, CiLV-C2, CiCSV e PfGSV) como dichorhavirus (ClCSV) (TASSI et al., 2019; DE LILLO et al., 2021). Não há evidências de co-transmissão de dois ou mais distintos VTBs pelo ácaro vetor, embora esta possibilidade não possa ser descartada. Há evidências preliminares de especificidade de certas populações desta espécie para com determinado VTB e variações na eficiência de transmissão por diferentes populações (TASSI et al., 2021).

1.1.4 *Cilevirus*

O gênero *Cilevirus*, pertencente à família *Kitaviridae*, deriva seu nome da espécie-tipo, *Citrus leprosis virus C*. Os cilevirus apresentam partículas curtas, baciliformes e envelopadas (50-60 nm x 110-120 nm), que podem estar agrupadas em cisternas do retículo endoplasmático ou isoladas, sendo possível a observação de uma inclusão densa no citoplasma das células infectadas, conhecida como viroplasma, provável local de replicação do vírus e/ou acúmulo de proteínas codificadas pelo vírus (LUIZON, 2009; CALEGARIO, 2009; QUITO-ÁVILA et al., 2020). Os vírions são constituídos de ssRNA linear, bissegmentado e senso positivo.

As moléculas de RNA são poliadeniladas nos terminais 3’ e contêm uma estrutura “cap” nos terminais 5’ (LOCALI-FABRIS; FREITAS-ASTÚA; MACHADO, 2012).

Atualmente este gênero é composto por quatro espécies reconhecidas pelo ICTV: *Citrus leprosis virus C*, *Citrus leprosis virus C2*, *Passion fruit green spot virus* e *Cilevirus oahuense* (ICTV, 2022). Há também uma espécie tentativa, *Solanum violifolium ringspot virus*, único cilevirus transmitido por *B. obovatus* (FERREIRA et al., 2007; DE LILLO et al., 2021). Os critérios utilizados para classificação das espécies de cilevirus estabelecem que haja 85% de identidade de aminoácidos para o proteoma e incluem gama de hospedeiros, extensão da relação sorológica, modo de transmissão e espécie do vetor. Além disso, a proteína putativa p24 é conservada em todos os cilevirus, não estando presente em nenhum outro gênero (QUITO-ÁVILA et al., 2020).

A replicação dos cilevirus ocorre no citoplasma da célula hospedeira, e os vírions se acumulam em vesículas formadas através da modificação do retículo endoplasmático. Por se tratar de um vírus de ssRNA (+), como demais vírus similares, após atingir o interior da célula o RNA é quase que imediatamente desencapsidado, os genes do vírus são reconhecidos e traduzidos pela maquinaria biossintética celular: ribossomos, tRNAs e aminoácidos. Na sequência as proteínas virais envolvidas na replicação recrutam o RNA viral e associam-se a proteínas da célula hospedeira, formando um complexo replicativo, em geral em estruturas associadas às membranas celulares, onde ocorre a produção das fitas de RNA complementares à fita do genoma do vírus, que são usadas como molde para a síntese de novas fitas de RNA viral (genômico), a qual é mais tarde, por sua vez, encapsidada, formando novas partículas do vírus. No caso, do CiLV-C a replicação e montagem das partículas virais ocorrem provavelmente nos viroplasmas, que são comumente observados no citoplasma da planta infectada. As partículas de cilevírus se acumulam no retículo endoplasmático e sua membrana/envelope provavelmente é proveniente de um processo de brotamento através das membranas desta organela (KITAJIMA et al., 2003a). Para a tradução, os cilevirus utilizariam a estratégia de RNAs subgenômicos, e no caso do CiLV-C pelo menos três são utilizados (MEDEIROS, 2015; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-ÁVILA et al., 2020).

1.1.4.1 *Passion fruit green spot virus* (PfGSV)

PfGSV foi recentemente caracterizado por Ramoz-González et al. (2020b), após sequenciamento completo de seu genoma, sendo inserido no gênero *Cilevirus*, possuindo 50-70% de semelhança na sequência de nucleotídeos com os demais membros deste gênero. Como membro típico deste gênero, apresenta genoma constituído por ssRNA sentido positivo e bissegmentado. As moléculas de RNA são poliadeniladas nos terminais 3' e apresentam estrutura tipo “cap” no terminal 5’. O RNA1 apresenta duas ORFs e o RNA2 cinco, codificando sete proteínas putativas. A ORF1 do RNA1 codifica a proteína RdRp (285,9 kDa), responsável pela replicação viral, apresentando domínio para metiltransferase, helicase e RNA polimerase dependente de RNA. A ORF2 deste mesmo RNA codifica a proteína putativa da capa proteica, a p29 (26,6 kDa). Quanto ao RNA2, a primeira ORF é responsável por codificar a proteína putativa p15 (15 kDa), exclusiva dos cilevirus, que parece estar envolvida na competitividade evolutiva, sendo bem distinta entre os membros do gênero. A segunda ORF do RNA2 corresponde a proteína putativa p13 (13 kDa) que não possui homologia com nenhuma outra, apresentando função desconhecida até o momento. ORF3 codifica a glicoproteína putativa p61 (61 kDA). ORF4 corresponde a proteína putativa de movimento, MP (32,6 kDa). A quinta e última ORF do RNA2 codifica a proteína p24 (24 kDa), a mais conservada entre os cilevirus, sendo esta uma proteína transmembrana (Figura 1) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020b; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2021).

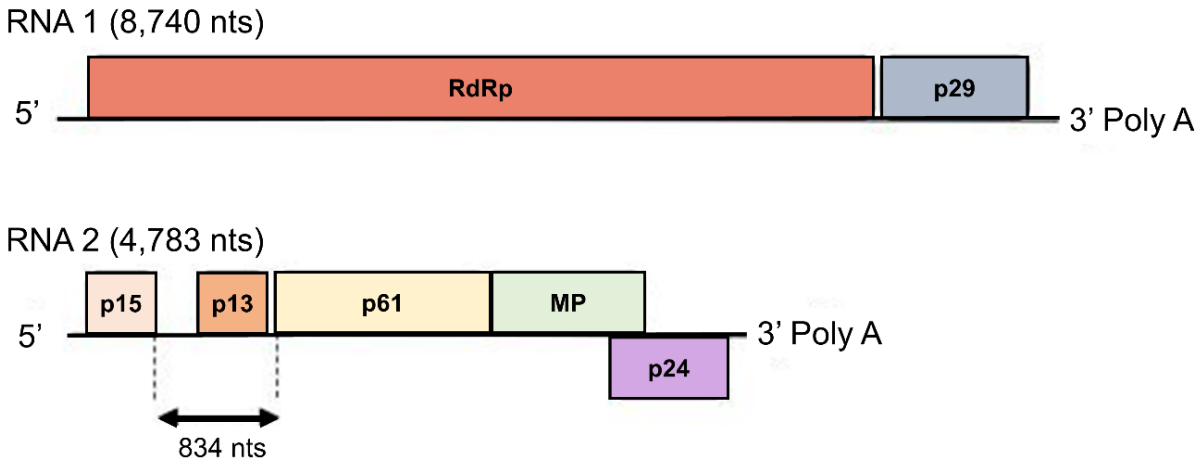


Figura 1: Organização do genoma de Passion fruit green spot virus (PfGSV). RdRp: RNA polimerase dependente de RNA; p29: proteína putativa capsidial; p15, p13, p61 e p24: proteínas com funções desconhecidas; MP: proteína putativa de movimento. Adaptado de Ramos-González et al. (2020b).

PfGSV é o agente causal da pinta verde do maracujazeiro, sendo transmitido pela espécie *B. yothersi* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LILLO et al., 2021). Embora recentemente caracterizado, foi relatado pela primeira vez na região de Vera Cruz – São Paulo, em 1997, quando ocasionou grandes prejuízos aos produtores devido à alta incidência e agressividade do isolado, que levou a morte prematura das plantas, destruindo os pomares (KITAJIMA et al., 1997). Atualmente encontra-se restrito a alguns estados brasileiros como Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Sergipe, Rondônia e Distrito Federal, não sendo relatado ocasionando danos graves, possivelmente por se tratar de isolados menos agressivos (KITAJIMA et al., 2003b; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020b).

Um outro VTB com descrição anterior a de PfGSV é o da leprose do *Ligustrum* (ligustrum leprosis virus – LigLV) com primeiro relato em 1942, na Argentina, quando foi encontrado infectando plantas de alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.), sendo transmitido por *B. obovatus* (VERGANI, 1942). Posteriormente, plantas com sintomas similares foram encontradas em alguns estados brasileiros, e através de sequenciamento pode-se verificar que se tratava de um isolado de PfGSV (LIMA et al., 1991; RODRIGUES; NOGUEIRA; FREITAS, 1995; KITAJIMA; RODRIGUES; FREITAS-ASTÚA, 2010; SAITO, 2020). Estudos com este isolado indicaram *B. yothersi* e *B. papayensis* como vetores (TASSI, 2018). Portanto, PfGSV já se encontrava no território brasileiro bem antes de seu primeiro relato (KITAJIMA et al., 1997), quando passou a causar danos em uma cultura agronomicamente importante, até então mantinha-se em hospedeiros de pouca importância agrícola, como o alfeneiro.

O hospedeiro principal de PfGSV é o maracujazeiro amarelo. Contudo, algumas espécies também são naturalmente infectadas por este vírus, como alfeneiro, madressilva (*Lonicera japonica* L.), árvore guarda-chuva [*Schefflera actinophylla* (Endl.) Harms.], manacá (*Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don), manta-do-rei [*Thunbergia erecta* (Benth.) T. Anderson], hera (*Hedera canariensis* Willd.) e hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) (KITAJIMA, RODRIGUES, FREITAS-ASTÚA, 2010; SAITO, 2020; COSTA-RODRIGUES et al., 2022).

A pinta verde do maracujazeiro apresenta sintomas restritos ao local de alimentação do ácaro vetor, pois PfGSV, assim como os demais VTBs, parece não se movimentar sistemicamente pela planta. Os sintomas podem ser observados nas folhas, frutos e ramos. Nos frutos e folhas é possível a observação dos sintomas

típicos da doença, manchas e/ou pintas verdes. No entanto, esta observação só é possível quando os frutos entram em processo de amadurecimento e as folhas em senescência. Nos caules, é possível observar lesões necróticas que quando em grande quantidade provocam anelamento dos ramos e posterior morte das plantas (Figura 2) (KITAJIMA et al., 1997; KITAJIMA et al., 2003b). O principal dano desta doença para a cultura é a depreciação do produto para o comércio *in natura*, principal destino da produção de maracujá-amarelo (CAVICHIOLI; CONTIERO; CELESTRINO, 2020; FISHER; REZENDE, 2021).

Embora relatado no final da década de 90, ainda pouco se sabe sobre este patossistema. Entretanto, com as informações disponíveis até o momento sabe-se que é um vírus com potencial para causar grandes prejuízos, caso não seja devidamente controlado, com isso, recomenda-se o monitoramento da população do vetor e seu controle precoce, visando evitar a disseminação do vírus pelo pomar (FISHER; REZENDE, 2021).

Figura 2: Sintomas da pinta verde do maracujazeiro, ocasionados pelo cilevirus passion fruit green spot virus (PfGSV), em diferentes tecidos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **A-** manchas verdes em folha senescente; **B-** pintas verdes em fruto maduro. Fonte: Laranjeira et al. (2011); **C-** lesões necróticas em ramo. Fonte: Antonioli-Luizon et al. (2009).

1.1.4.2 *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C)

CiLV-C é a espécie-tipo do gênero *Cilevirus*, apresentando genoma constituído de ssRNA, bissegmentado e senso positivo. As moléculas de RNA são poliadeniladas nos terminais 3' e contêm uma estrutura tipo “cap” no terminal 5’. O RNA1 apresenta duas ORF e o RNA2 quatro (PASCON et al., 2006). A ORF1 do RNA1 codifica uma proteína de 286 kDa, envolvida na replicação viral, identificada como RdRp, que contém domínios conservados para metiltransferase, cisteína protease, helicase e RNA polimerase dependente de RNA. A ORF2 do RNA1

codifica uma proteína putativa da capa proteica, a p29 (29 kDa), que também atua no processo de silenciamento de RNA. Já a ORF1 do RNA2 codifica uma proteína putativa, denominada de p15 (15 kDa), presente apenas nos cilevirus, que parece atuar como supressora do silenciamento de RNA. A ORF2 codifica uma proteína putativa taxonomicamente restrita aos cilevirus, a p61 (61 kDa), que se assemelha a uma glicoproteína e parece ser essencial para a transmissão viral, estando envolvida na interação vírus-vetor, além de apresentar atividade como efetor viral. ORF3 codifica uma proteína putativa de movimento, identificada como MP (32 kDa). E a ORF4 codifica uma proteína putativa de 24 kDa, a p24, sendo esta uma proteína estrutural que atua na replicação e montagem viral (Figura 3) (LOCALI-FABRIS; FREITAS-ASTÚA; MACHADO, 2012; LEASTRO et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; 2021; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; ARENA et al., 2016; 2020; LEASTRO et al., 2020).

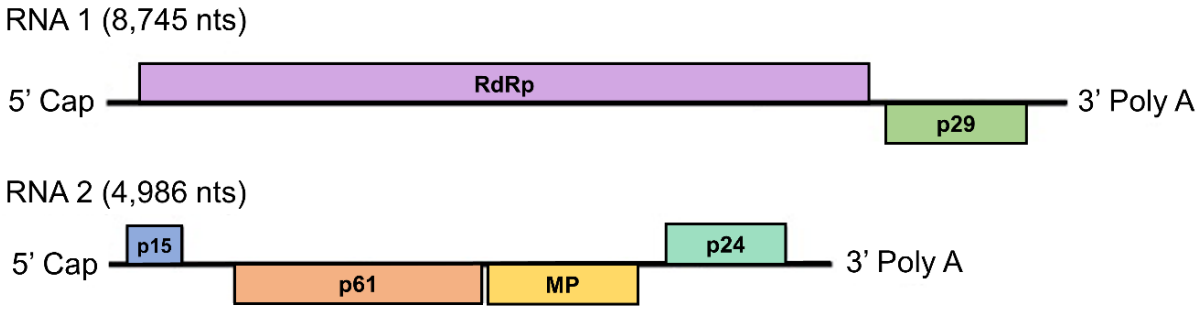


Figura 3: Organização genômica de Citrus leprosis virus C (CiLV-C). RdRp: RNA polimerase dependente de RNA; p29: proteína putativa capdisial; p61 e p24: proteínas putativas estruturais; MP: proteína putativa de movimento; p15: proteína putativa com atuação no silenciamento de RNA. Adaptado de Locali-Fabris, Freitas-Astúa e Machado (2012).

Conforme mencionado anteriormente a leprose dos citros é o patossistema dos VTB mais importante economicamente e o mais estudado. Sabe-se que a síndrome da leprose pode ser causada por vários vírus, tanto cile- como dichorhavírus, embora CiLV-C seja, de longe, o mais disseminado, agressivo e importante (BASTIANEL et al., 2010; ROY et al., 2013; 2015; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018).

CiLV-C é considerado o vírus mais devastador que infecta citros no Brasil, causando prejuízos significativos para o setor citrícola. Além da relevância da leprose dos citros para a citricultura brasileira, a doença apresenta importância mundial nos últimos anos, estando presente desde a Argentina até o México

(BASTIANEL et al., 2006; BASSANEZI, 2019). No Brasil foram identificadas duas estirpes de CiLV-C, conhecidas como CRD (Cordeirópolis) e SJP (São José do Rio Preto). CRD é a mais disseminada, inclusive fora do Brasil, porém a SJP vem se estabelecendo rapidamente e substituindo CRD nos pomares do estado de São Paulo (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

Tangerinas (*Citrus reticulata* L.), pomelos (*C. paradisi* L.), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*), lima da pérsia (*C. limettioides* Tan.), limas ácidas (*C. aurantifolia* Swing.) e limas doces (*C. limettioides* Tanaka) apresentam-se tolerantes a doença, já os limões (*C. limon* (L.) Burm.), são aparentemente imunes ao vírus. No entanto, as laranjas-azedas (*C. aurantium* L.) mostram-se suscetíveis e as laranjas-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) são altamente suscetíveis a doença (MATTOS JÚNIOR et al., 2005; COVIELO; ANDRADE, 2017; BASTIANEL et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020a). Experimentalmente, CiLV-C é capaz de infectar 40 espécies de plantas, pertencentes a 18 famílias botânicas, embora naturalmente tenha sido encontrado infectando apenas duas espécies não cítricas: *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. e *Commelina benghalensis* L. (LÉON et al., 2006; NUNES et al., 2012; GARITA et al., 2014).

A doença tem como principal característica a produção de lesões restritas aos locais de alimentação do vetor, o ácaro *B. yothersi*. As lesões podem ser encontradas tanto nas folhas como nos frutos e ramos infectados e podem ser observadas de 17 a 60 dias após a infecção. Nos frutos as lesões são necróticas, marrons, lisas ou ligeiramente deprimidas, podendo apresentar rachaduras no centro, e comumente apresentam halo amarelado nos frutos ainda verdes e halo esverdeado nos frutos maduros, resultando na depreciação do produto para o comércio *in natura*. Mas as lesões se restringem ao pericarpo e mesocarpo, não afetando a qualidade do suco. As lesões foliares podem ser observadas nas duas faces da folha, sendo arredondadas, lisas, de coloração verde clara e borda amarela, que com o progresso podem apresentar anéis necróticos e/ou cloróticos. Nos ramos, as lesões iniciam-se como manchas cloróticas que evoluem para necróticas e salientes, ocasionando ruptura da casca o que pode resultar na seca e morte descendente dos ramos e da planta, quando em alta incidência (Figura 4) (BASSANEZI, 2019; DE LILLO et al., 2021).

A lesão foliar ocasiona redução da taxa fotossintética da planta, e quando em grande quantidade provoca a queda das folhas. Alta taxa de infecção,

principalmente na região próxima ao pedúnculo, resulta na queda prematura dos frutos e pode resultar na morte da planta em decorrência do definhamento dos ramos. A taxa de queda de frutos provocada pela doença tem aumentado nos últimos anos, passando de 1,7% na safra 2020/2021 para 2,83% na safra 2021/2022, ocupando o quarto lugar entre as principais pragas e doenças que ocasionam queda prematura de frutos. Este aumento pode ser explicado pelo aumento da população de ácaros em virtude do déficit hídrico durante a safra, condição que favorece o estabelecimento do vetor. Em condições de incidência severa, a doença pode tornar o pomar economicamente inviável, devido à baixa produtividade (COVIELO; ANDRADE, 2017; BASSANEZI, 2019; BASSANEZI; ANDRADE, 2021; FUNDECITRUS, 2022).

Figura 4: Sintomas de leprose dos citros, ocasionados pelo cilvevirus citrus leprosis virus C (CiLV-C), em diferentes tecidos de laranja-doce (*Citrus sinensis)*. **A-** ramo seco em virtude da ruptura da casca. Fonte: Bassanezi (2019); **B-** folha com lesões necróticas em estado avançado; **C-** lesões locais necróticas com halo amarelado em frutos.

A relação vírus-vetor para este patossistema é do tipo persistente circulativa, com período de acesso à aquisição e inoculação de 4 e 2 horas, respectivamente, e período de latência de 7 horas, conforme verificado por Tassi et al. (2017). Todas as fases de vida móveis do ácaro são capazes de adquirir e transmitir o vírus. O vírus após ser adquirido pelo vetor, cruza a barreira intestinal, circula pelo reduzido celoma e retorna para as glândulas salivares, atingindo o canal estiletar quando é injetado em outra célula da planta hospedeira, juntamente com a saliva do vetor, iniciando o processo de infecção (TASSI et al., 2017). Os dados sobre a ocorrência de multiplicação do vírus no vetor até o momento são controversos, onde ensaios

moleculares apontam para uma possível replicação de CiLV-C no vetor, entretanto, os dados biológicos não corroboram com esta informação (ROY et al., 2015; TASSI et al., 2017).

De acordo com Bassanezi (2019), a principal medida de controle utilizada para a doença, baseia-se no controle químico do ácaro-vetor, através da aplicação de acaricidas. Tem-se atualmente 54 acaricidas registrados para a cultura (AGROFIT, 2022). Vale mencionar que todos estes produtos apresentam registro para controle de *B. phoenicis*, como foi inicialmente identificado o ácaro-da-leprose. Algumas populações do vetor já apresentam resistência a alguns destes produtos utilizados, devido ao seu uso contínuo e sequencial (SILVA JÚNIOR et al., 2021), como hexitiazoxi (CAMPOS; OMOTO, 2002), propargito (FRANCO, 2002) e espirodiclofeno (ROCHA et al., 2021). Com isso, as medidas complementares de controle passam a receber maior atenção, como a poda de ramos sintomáticos, que apresenta grande eficiência, tendo em vista que o vírus não infecta a planta sistemicamente; a retirada de frutos sintomáticos da planta e presentes no solo; eliminação de plantas hospedeiras do vetor e do vírus; controle de outras doenças, visando evitar lesões que sirvam de abrigo para o ácaro; desinfestação de equipamentos; e demais medidas que impeçam a disseminação do vírus e do vetor (BASSANEZI, 2019). Até recentemente o manejo da leprose em pomares, via uso de acaricidas, mostrava-se eficiente, mantendo a virose em níveis aceitáveis. No entanto, está ocorrendo um recrudescimento de sua incidência, em função das alterações nos tratamentos fitossanitários da cultura cítrica pela introdução de outra enfermidade, mais severa, o HLB (huanglongbing), causada pela bactéria *Candidatus* Liberibacter spp., tais como uso intensivo de inseticidas e redução do espaçamento entre plantas (BASSANEZI, 2021). Há também o efeito de misturas em tanque entre acaricidas e inseticidas que reduzem a eficiência do acaricida (DELLA VECCHIA, FERREIRA, ANDRADE, 2018).

1.1.5 *Brevipalpus yothersi*

Os ácaros do gênero *Brevipalpus* são popularmente conhecidos como ácaros chatos ou ácaros planos. Este gênero compreende cerca de 318 espécies descritas, porém apenas 292 encontram-se validadas (CASTRO et al., 2020). A distribuição das espécies é mundial e sua importância está relacionada principalmente a capacidade de atuarem como vetores de vírus de plantas (MUSUMECI; ROSETTI,

1963; KNORR, 1968; CHAGAS, 1978; KITAJIMA et al., 1997, 2008; ROY et al., 2015; RAMOS-GONZALEZ et al., 2016; 2017; 2018; NUNES et al., 2018; TASSI et al., 2019; DE LILLO et al., 2021).

Dentre as espécies de *Brevipalpus* descritas, *B. yothersi* (Acari: Prostigmata: Tetranychoidea: Tenuipalpidae) parece ser a espécie de maior importância agrícola, em virtude da sua ação como vetor de um grande número de viroses (Tabela 1), dentre as quais a de maior destaque no Brasil atualmente, a leprose dos citros (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; TASSI et al., 2017; BASSANEZI et al., 2019; DE LILLO et al., 2021).

As principais características morfológicas utilizadas para identificação de espécies de *Brevipalpus* são o número de setas dorsais e de solenídeos no tarso da perna II, além do padrão de reticulação dorsal e ventral. Além destas características, ferramentas moleculares devem ser utilizadas para auxiliar na identificação, tendo em vista a grande diversidade de espécies crípticas dentro do gênero (WELBOURN et al., 2003; BEARD et al., 2015; NAVIA et al., 2013; 2019; ALVES et al., 2019). A espécie *B. yothersi* apresenta tarso II com 2 solenídios, padrão de reticulação dorsal em formato de V e ausência da seta *f2* no opistossoma, apresentando apenas 12 pares de setas dorsais (BEARD et al., 2015; TASSI et al., 2017; TASSI, 2018). Detalhes de sua anatomia interna acham-se descritos (ALBERTI; KITAJIMA, 2014).

Brevipalpus yothersi apresenta reprodução por paternogênese telítoca (fêmea origina fêmea) devido a presença da bactéria endossimbionte do gênero *Cardinium* que ocasiona a feminilização dos machos (WEEKS et al., 2001). Seu ciclo de vida compreende as fases móveis de larva, protoninfa, deutoninfa e adulto, além das fases imóveis de ovo, protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida. Os ovos, alaranjados, apresentam cerca de 0,084 mm de comprimento e a fêmea adulta tem cerca de 0,3 mm, apresentando coloração avermelhada (WELBOURN et al., 2003; AMARAL, 2016; TASSI, 2018). A duração das diferentes fases de vida pode ser reduzida ou aumentada de acordo com as condições ambientais. A duração de ovo a adulto pode variar de 14 dias, quando em uma temperatura de 30 °C, e até mais de 40 dias quando em temperaturas amenas (cerca de 20 °C) (CHIAVEGATO, 1986), sendo, portanto, a condição de clima seco e quente a mais favorável para seu desenvolvimento.

Referências

AGROFIT, 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 agosto 2022.

AFONSO, C.L.; AMARASINGHE, G.K.; BÁNYAI, K.; BÀO, Y.; BASLER, C.F.; BAVARI, S.; BEJERMAN, N.; BLASDELL, K.R.; BRIAND, F-X.; BRIESE, T. et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. **Archives of Virology**, v. 161, p. 2351-2360, 2016.

ALBERTI, G.; KITAJIMA, E.W. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) - Economically important plant-virus vectors. **Zoologica**, v. 160, p. 1-192, 2014.

ALVES, J.L.S.; FERRAGUT, F.; MENDONÇA, R.S.; TASSI, A.D.; NAVIA, D. A new species of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) from the Azores Islands, with remarks on the *B. cuneatus* species group. **Systematic and Applied Acarology**, v. 24, p. 2184-2208, 2019.

AMARAL, I. **Biologia e tabela de vida de *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) oriundos de diferentes regiões citrícolas do estado de São Paulo**. 2016. 35 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2016.

ANTONIOLI-LUIZON, R.; BARBOSA, C.J.; LARANJEIRA, F.F.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA. Diagnóstico da pinta verde/definhamento precoce do maracujazeiro. **Comunicado Técnico 132**, 5 p., 2009.

ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; FALK, B.W.; CASTEEL, C.L.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Plant immune system activation upon *Citrus leprosis virus* C infection is mimicked by the ectopic expression of the p61 viral protein. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 20 p., 2020.

ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; NUNES, M.A. Citrus leprosis virus C infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 17 p., 2016.

BASSANEZI, R.B. **Aumento da leprose nos pomares: motivos e recomendações para o manejo eficiente**. Comunicação Fundecitrus, 2021. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/aumento-da-leprose-nos-pomares-motivos-e-recomendacoes-para-o-manejoeficiente/1043>. Acesso em: 19 maio 2022.

BASSANEZI, R.B. Manual de leprose dos citros: medidas essenciais de controle. 3. ed. Araraquara: **Fundecitrus**, 23 p., 2019.

BASSANEZI, R.B.; ANDRADE, D. Rotação de acaricidas contribui no controle do ácaro da leprose em citros. **Revista Cultivar**, 2021. Disponível em: <https://revistacultivar.com.br/noticias/rotacao-de-acaricidas-contribui-no-controle-do-acaro-da-leprose-em-citros>. Acesso em: 19 maio 2022.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 211-220, 2006.
BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KITAJIMA, E.W.; KIBO, K.S.; BASSANEZI, R.B.; MACHADO, M.A., FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis: centennial of na unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, v. 94, p. 284-292, 2010.

BASTIANEL, M.; PEREIRA-MARTIN, J.A.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NUNES, M.A. Citrus leprosis resistance within the citrus group. **Virus Disease**, v. 29, p. 491–498, 2018.

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

BRUCKNER, C.H.; SANTOS, C.E.M.; BORÉM, A. **Maracujá: do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: UFV, v. 1, 192 p., 2021.

CALEGARIO, R.F. **Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**. 2009. 123 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2009.

CAMPOS, F.J.; OMOTO, C. Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. **Experimental & Applied Acarology**, v. 26, p. 243-251, 2002.

CASTRO, E.B.; MESA, N.C.; FERES, R.J.F.; MORAES, G.J.; OCHOA, R.; BEARD, J.J.; DEMITE, P.R. A newly available database of an important family of phytophagous mites: Tenuipalpidae Database. **Zootaxa**, v. 4868, p. 577-583, 2020.

CAVICHIOLI, J.C.; CONTIERO, L.A.F.; CELESTRINO, R.B. Maracujá: Nordeste ainda domina cultivo. **Campo & Negócios**, 2020.

COOK, G.; KIRKMAN, W.; CLASE, R.; STEYN, C.; BASSON, E.; FOURIE, P.H.; MOORE, S.D.; GROUT, T.G.; CARSTENS, E.; HATTINGH, V. Orchid fleck virus associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 1373-1379, 2019.

COSTA-RODRIGUES, M.; PEREIRA, L.R.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; TASSI, A.D.; LEÃO, I.G.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. First report of *Passion fruit green spot virus* infecting hibiscus plants. **New Disease Reports**, v. 45, e12080, 2022.

COVIELO, V.A.; ANDRADE, D. **Leprose dos citros: características dos frutos X severidade da doença**. Jaboticabal: Novas Edições Acadêmicas, 85 p., 2017.

CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; TASSI, A.D.; GUERRA-PERAZA, O.; KITAJIMA, E.; HARAKAVA, R.; BESERRA Jr., J.E.A.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-

ASTUA, J. Identification and characterization of *citrus chlorotic spot virus*, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease**, v. 102, p. 1588-1598. 2018.

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

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, p. 913-816, 1986.

DELLA VECHIA, J.F.; FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.J. Interaction of spirodiclofen with insecticides for the control of *Brevipalpus yothersi* in citrus. **Pest Management Science**, v. 74, p. 2438–2443, 2018.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

DIETZGEN, R.G.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; GOODIN, M.M.; KONDO, H. TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Dichorhaviruses in their host plants and mite vectors. **Advances in Virus Research**, v. 102, p. 119-148. 2018.

DIETZGEN, R.G.; KUHN, J.H.; CLAWSON, A.N.; FREITAS-ASTÚA, J.; GOODIN, M.M.; KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; WETZEL, T. WHITFIELD, A.E. Dichorhavirus: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses**. Archives of Virology**, v. 159, p. 607-619, 2014.

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

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

FISHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Manejo de doenças. In: BRUCKNER, C.H.; SANTOS, C.E.M.; BORÉM, A. **Maracujá: do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: UFV, v. 1, cap. 8, p. 122-141, 2021.

FUNDECITRUS – Fundo de Defesa da Citricultura. Estimativa da safra 2021/2022 de laranja no parque citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. **Pesquisa de Estimativa de Safra – PES**, 11 abril 2022.

FRANCO, C.R. **Detecção e caracterização da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida propargite**. 2002. 64 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – ESALQ/USP, Piracicaba, 2002.

FREITAS-ASTÚA, J.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; ARENA, G.D.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Oppinion in Virology**, v. 33, p. 66-73, 2018.

FREZZI, M.S. La lepra explosiva del naranjo- Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bella Vista (Corientes). **Boletin de Fruiticultura y Horticutura**, v. 5, 16 p., 1940.

GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; ROMÃO, G.O.; KITAJIMA, E.W. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**., v. 39, p. 27–39, 2014.

GIRARDI, E.A.; POMPEU JÚNIOR, J.; SOBRINHO, J.T.; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S.; CRISTOFANI-YALY, M.; SEMPIONATO, O.R.; STUCHI, E.S.; DONADIO, L.C.; MATTOS JÚNIOR, D.; BASSANEZI, R.B.; GARCIA, L.A.P.; AYRES, A.J. **Guia de reconhecimento dos citros em campo**. 1. ed. Araquara: Fundecitrus, 158 p., 2021.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Cilevirus**, 2022. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/283/cilevirus>. Acesso em: 02 maio 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Maracujá**, 2020.

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

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

KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Acrinotrichida) Part 1. An update on the biology and economical importance of *Brevipalpus* mites. **Zoologica**, v. 160, p. 1-10, 2014.

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

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

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

KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in Citrus. **Proceedings 4th Conference International Organization of Citrologists Virologists**, p. 332-341, 1968.

LARANJEIRA, F.; SILVA, S.X.B.; ANDRADE, E.C.; ALMEIDA, D.O.; KITAJIMA, E.W.; NAVIA, D.; FREITAS-ASTÚA, J. Mapeamento e caracterização de viroses associadas a *Brevipalpus* sp. na Bahia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 56**, 25p., 2011.

LEASTRO, M.O.; CASTRO, D.Y.O.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; PALLÁS, V. SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. Citrus leprosis virus C encodes three proteins with gene silencing suppression activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 6 p., 2020.

LEASTRO, M.O.; KITAJIMA, E.W.; SILVA, M.S.; RESENDE, R.O.; FREITAS-ASTÚA, J. Dissecting the subcellular localization, intracellular trafficking, interactions, membrane association, and topology of *Citrus leprosis virus* C proteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 26 p., 2018.

LEÓN, G.A.; REALPE, C.E.; GARZON, P.; RODRIGUEZ, J.A.; MORENO, M.G.; CHILDERS, C.C.; ACHOR, D.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease**, v. 90, p. 682, 2006.

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

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A.: **Genus Cilevirus. International Committee on Taxonomy of Viruses**. In: Virus Taxonomy. Edited by KING, A.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.; LEFKOWITZ, E. Elsevier/Academic Press, p.1139-1142, 2012.

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

LUIZON, R.A. **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus – PfGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética**. 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), ESALQ/USP, Piracicaba, 2009.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros: principais informações e recomendações de cultivo**. Campinas: Instituo Agronômico de Campinas. 9 p., 2005.

MEDEIROS, R.B. Replicação, organização e expressão gênica. In: MEDEIROS, R.B.; RESENDE, R.O.; CARVALHO, R.C.; DIANESE, É.C.; COSTA, C.L.; SGRO, J. (eds.). **Virologia Vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle**. Brasília: Universidade de Brasília, cap. 8, p. 219-251, 2015.

MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V.V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, v. 15, p. 228. 1963(res).

NAVIA, D.; MENDONÇA, R.S.; FERRAGUT, F.; MIRANDA, L.C.; TRINCADO, R.C.; MICHAUX, J.; NAVAJAS, M. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologica Scripta**, v. 42, p. 406-426, 2013.

NAVIA, D.; NOVELLI, V.M.; ROMBAUTS, S.; FREITAS-ASTÚA, J.; MENDONÇA, R.S.; NUNES, M.A; MACHADO, M.A.; LIN, Y.C.; LE, P.; ZHANG, Z.; GRBIC, M.; WYBOUW N.; JOHANNES, A.J.; LEEUWEN, T.V.; PEER, Y.V. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, e01563-18, 2019.

NUNES, M.A.; MINEIRO, J.L.C.; ROGERIO, L.A.; FERREIRA, L.M.; TASSI, A.D.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J. First report of *Brevipalpus papayensis* as vector of *coffee ringspot virus* and *citrus leprosis virus* C. **Plant Disease**, v. 102, p. 1046, 2018.

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

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.I.; FRANCO, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.L.; FRANCHISCINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated vírus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Virus Genes**, v. 32, p. 289-298, 2006.

QUITO-AVILA, D.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; MELZER, M.J. Bluner-, Cile- and Higreviruses (Kitaviridae). **Reference Module in Life Sciences**, 5 p., 2020.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; BANGUELA-CASTILLO, A.; TASSI, A.D.; RODRIGUES, M.C.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; FREITAS-ASTÚA, J. Unveiling the complete genome sequence of clerodendrum chlorotic spot virus, a putative dichorhavirus infecting ornamental plants. **Archives of Virology**, v. 163, p. 2519-2524, 2018.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BRETON, M.C.; ARENA, G.D.; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus* C. **Viruses**, v. 8, p. 153-177, 2016.

RAMOS-GONZALEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C., GUERRA-PERAZA, O.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus* N: a new *Dichorhavirus* causing citrus leprosis disease. **Phytopathology**, v. 107, p. 963-976, 2017.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; HARAKAVA, R.; NOME, C.F.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J. A novel lineage of cile-like viruses discloses the phylogenetic continuum across the family *Kitaviridae*. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 22 p., 2022.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; FREITAS-ASTÚA, J.; BASSANEZI, R.B.; CHABI-JESUS, C.; TASSI, A. D.; KITAJIMA, E. W. Mal inquietante. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, n. 124, 2020a.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; PONS, T.; CHABI-JESUS, C.; ARENA, G.D. FREITAS-ASTUA, J. Poorly conserved p15 proteins of cileviruses retain elements of common ancestry and putative functionality: a theoretical assessment on the evolution of cilevirus genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 17 p., 2021.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 16p., 2020b.

REZENDE, J. AM.; KITAJIMA, E.W. Vírus e Viroides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 10, p. 161-180, 2018.

ROCHA, C.; DELLA VECHIA, J.; SAVI, P.; OMOTO, C.; ANDRADE, D. Resistance to spirodiclofen in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) from brazilian citrus groves. **Pest Management Science**, v. 77, p. 3099-3106, 2021.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S. Ringspot of *Ligustrum lucidum* Aiton, a new disease transmitted by *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae) in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 292, 1995.

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

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

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

Brevipalpus. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

SANTOS, A. **A importância da citricultura nacional**. CNA Brasil, 2019. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/noticias/a-importancia-da-citricultura-nacional#:~:text=A%20%C3%A1rea%20plantada%20chega%20a,1%25%20com%20rela%C3%A7%C3%A3o%20a%202018>. Acesso em: 12 maio 2022.

SILVA JÚNIOR, G.J.; BEHLAU, F.; MIRANDA, M.P.; BASSANEZI, R.B.; ANDRADE, D.J. **Guia de controle de pragas e doenças** – Fundecitrus. 9 p., 2021.

TASSI, A.D. **Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus**. 2018. 263 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2018.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREISTAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v.71, p. 227-241, 2017.

TASSI, A.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Diferencial transmission of citrus leprosis virus C strains by *Brevipalpus yothersi* subpopulations. **Anais 52 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, p.169, 2021.

TASSI, A.D.; SAITO, M.S.G.; NUNES, M.A.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Reavaliação das espécies do ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus*, vetores de vírus de plantas. **Anais 51 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Recife. p.775, 2019.

VERGANI, A.R. La transmission de la lepra explosiva de la ligustrina por ácaros. **Revista Argentina de Agronomia**, v. 9, p. 292-294, 1942.

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

WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; JANE, E.C.; ERBE, E.F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) incluiding comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 107-133, 2003.

2 GAMA DE HOSPEDEIROS NATURAIS E EXPERIMENTAIS DE *Passion fruit green spot virus*

Resumo

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) é a espécie de maracujá mais cultivada no Brasil, sendo este o maior produtor desta fruta. Acham-se descritos vários vírus infectando maracujá-amarelo, incluindo o agente causal da pinta verde do maracujazeiro, o passion fruit green spot virus (PfGSV), um dos mais recentemente descrito. Este vírus, detectado originalmente no estado de São Paulo, foi também encontrado em alguns outros estados brasileiros. É considerado atualmente um patógeno secundário para a cultura. Entretanto, quando relatado pela primeira vez ocasionou sérios prejuízos, indicando sua importância caso não seja devidamente controlado. Embora relatado há muitos anos, apenas recentemente teve seu genoma conhecido e identificado como um membro do gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, do grupo de vírus referido como VTB (Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*). Há ainda carência de diversas informações sobre o patossistema desta virose, relacionadas à compreensão de sua patologia, filogenia, epidemiologia e, por conseguinte, acerca da tomada de decisões para o estabelecimento de medidas de controle. No presente trabalho foram avaliadas diferentes espécies de plantas, quanto à suscetibilidade ao PfGSV, através da inoculação com ácaros virulíferos e da inoculação mecânica, para a qual utilizou-se folhas sintomáticas de maracujá-amarelo e alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) como fontes de inóculo. Foram feitos também levantamentos de plantas que estivessem naturalmente infectadas pelo PfGSV. A confirmação do PfGSV em plantas naturalmente ou experimentalmente infectadas foi feita através de ensaios de RT-PCR com primers específicos. Complementação da detecção foi feita em exames ultraestruturais ao microscópio eletrônico de transmissão através da observação de efeitos citopáticos característicos para cilevirus. A transmissão mecânica do PfGSV para plantas indicadoras pode ser demonstrada, utilizando-se folhas sintomáticas de maracujá como inóculo. Das 160 espécies desafiadas por inoculação com ácaros virulíferos, 18 mostraram-se suscetíveis. Nos ensaios de transmissão mecânica logrou-se infectar 4 das 12 plantas-testes e nos levantamentos feitos, foram identificadas 9 espécies, naturalmente infectadas pelo PfGSV.

Palavras-chave: Pinta verde do maracujazeiro, Maracujá-amarelo, Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

Abstract

The yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) is the most cultivated passion fruit species in Brazil, the world largest producer. Several virus diseases have been reported affecting passion fruit, being passion fruit green spot virus (PfGSV), one of the most recently described. This virus, originally described in the state of São Paulo, has been reported also in some other Brazilian states. Thought causing severe losses to the yellow passion fruit culture when first described, is currently considered a disease of secundar importance. Although described about two decades ago, PfGSV genome was only recently fully characterized and identified as a member of the genus *Cilevirus,* family *Kitaviridae*,

belonging to a group referred to as *Brevipalpus* mite-transmitted viruses (BTV). PfGSV pathosystem still lack information regarding pathology, phylogeny, epidemiology and strategies for its control. In the present work, we sought to evaluate different species of plants, regarding their susceptibility to PfGSV, when inoculated mechanically or by viruliferous vector. Approximately 160 species of plants were assayed. Parallely, survey for plant species, naturally infected by PfGSV, was made. PfGSV-infected yellow passion fruit or privet (*Ligustrum sinense* Lour.) leaves were used as source of inoculum. Infection by PfGSV was confirmed by molecular assays on leaves of symptomatic samples, after total RNA extraction followed by RT-PCR with specific primers. These assays were complemented by examination of symptomatic samples by transmission electron microscopy to confirm the viral infection, through the observation of characteristic cytopathic effects induced by cileviruses. Symptomatic passion fruit leaves was a suitable source of inoculum for mechanical transmission assays. Of 160 plant species assayed by vector transmission of PfGSV, 18 revealed to be susceptible. Mechanical transmission attempts resulted in the infection of 4, from the 12 tested. In the surveys made, 9 plant species were found naturally infected by PfGSV.

Keywords: Passion fruit green spot, Yellow passion fruit, *Brevipalpus*-Transmitted Viruses, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

2.1 Introdução

Passion fruit green spot virus (PfGSV) é o agente causal da doença conhecida como pinta verde do maracujazeiro. Esta doença apresenta como sintoma característico manchas verdes em frutos maduros e folhas senescentes, e lesões necróticas nos caules. Em casos severos, as lesões caulinares podem se fundir, causando anelamento e morte prematura da planta. Exames citopatológicos do tecido sintomático revelam a presença de viroplasmas eléctron-densos no citoplasma e partículas virais baciliformes curtas (50–70 nm×100–120 nm), providas de membrana e contidas em cavidades do retículo endoplasmático (KITAJIMA et al., 1997; 2003). Este vírus teve recentemente seu genoma caracterizado e incluído ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*. Seu genoma é constituído de RNA de fita simples (ssRNA), bissegmentado (5 e 9 kb) e senso positivo. O RNA1 apresenta duas fases abertas de leitura (Open reading frames – ORF) e o RNA2 cinco (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). É um vírus transmitido por ácaros da espécie *Brevipalpus yothersi* Baker (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LILLO et al., 2021), pertencendo ao grupo de vírus conhecido como VTB (Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*).

Assim como os demais VTBs, PfGSV parece não se movimentar sistemicamente na planta, permanecendo restrito aos locais de alimentação do

ácaro-vetor, onde os sintomas se manifestam. Embora ocasione apenas lesões localizadas, já provocou perdas consideráveis quando em alta incidência, como ocorreu em pomares de maracujá na região de Vera Cruz - SP, quando relatado pela primeira vez em 1997, ocasião em que pomares inteiros se perderam pela morte prematura das plantas (KITAJIMA et al., 1997). Atualmente, PfGSV tem sido constatado em alguns outros estados brasileiros, porém raramente ocasionando infecções severas (KITAJIMA et al., 2003; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

O hospedeiro principal deste vírus é o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Contudo, verificou-se recentemente que PfGSV infecta naturalmente outras plantas como alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) (SAITO, 2020) e hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) (COSTA-RODRIGUES et al., 2022), suspeitando-se que possa ter uma ampla gama de hospedeiras naturais e experimentais. Sendo assim, o presente trabalho visou identificar espécies suscetíveis à infecção de PfGSV, através de levantamento de plantas naturalmente infectadas, bem como daquelas infectadas experimentalmente com ácaros virulíferos, além de verificar a possibilidade de transmissão mecânica deste vírus. Sabe-se que alguns dos cilevirus já foram transmitidos mecanicamente, como CiLV-C (COLARICCIO et al., 1995; FERREIRA et al., 2007), mas não há dados concretos sobre este tópico com PfGSV. Além disso, algumas das plantas utilizadas para transmissão do vírus com vetor podem não ser hospedeiras do ácaro, portanto, este não irá se alimentar das mesmas, não havendo transmissão viral. Com isso, o ensaio de transmissão mecânica objetivou também analisar se diferentes espécies são hospedeiras do vírus independente da ação do vetor.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Colônia de *Brevipalpus* spp.

Utilizou-se no presente trabalho colônia de *Brevipalpus* spp., proveniente de plantas de alfeneiro naturalmente infestadas, coletadas em parques e jardins de Piracicaba - SP. Os ácaros foram mantidos em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) em folhas destacadas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC).

2.2.2 Fontes de inóculo

Utilizou-se como fonte de inóculo de PfGSV folhas de alfeneiro com sintomas típicos da infecção por este vírus (manchas ou anéis cloróticos), coletadas em parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba – SP. Optou-se por utilizar o isolado de *L. sinense*, devido a infecção de alfeneiros pelo PfGSV ser frequente, e assim pode-se sempre dispor de inóculo para os experimentos; os ácaros utilizados nos ensaios alimentaram-se bem nesta hospedeira; os sintomas da infecção por este vírus em maracujá-amarelo só são visíveis quando a folha se encontra em processo de senescência, o que inviabiliza a alimentação dos ácaros nesta fonte de inóculo por mais de dois dias. Além disso, em ensaios prévios pode-se observar que os ácaros utilizados não se adaptam bem às folhas sintomáticas de maracujá; sabe-se, pelos sequenciamentos realizados anteriormente, que este vírus que infecta alfeneiro corresponde ao isolado BSB1 (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) que apresenta alta similaridade (RNA1 > 99,1% e RNA2 > 97,3%) com o isolado Snp1 de PfGSV, tido como referência para o vírus.

Folhas de maracujá-amarelo sintomáticas (manchas/pintas verdes) também foram utilizadas como fonte de inóculo para os experimentos de transmissão mecânica.

A presença do vírus nas fontes de inóculo foi comprovada por ensaios prévios de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) utilizando iniciadores específicos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

2.2.3 Gama de hospedeiros de PfGSV – transmissão com vetor e infecção natural

Para a determinação da gama de hospedeiros de PfGSV, aproximadamente 160 espécies de plantas (Tabela 1), incluindo ornamentais, frutíferas, hortaliças, leguminosas e outras, foram produzidas e mantidas em condições de casa de vegetação para posterior inoculação com ácaros virulíferos.

Ácaros *Brevipalpus* spp., previamente mantidos em folhas sintomáticas de *L. sinense,* durante 48 horas para aquisição do vírus, foram transferidos, em grupos de 20 ácaros, para folhas das plantas-teste. Após inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por aproximadamente dois meses, onde foram avaliadas diariamente quanto ao surgimento de lesões resultantes da infecção ocasionada por PfGSV. As plantas que apresentaram sintomas, quando possível,

foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão e quando em quantidade suficiente de tecido sintomático, realizou-se a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos, visando a confirmação da presença do vírus nas lesões.

Ademais, plantas com sintoma característico da doença, quando encontradas durante coleta de material vegetal, foram também analisadas como descrito anteriormente, visando a comprovação da infecção por PfGSV.

2.2.4 Gama de hospedeiros de PfGSV – transmissão mecânica

Foram feitos ensaios utilizando-se solução tampão composta por tampão fosfato 0,01M, Dieca 0,005M, EDTA 0,001M e Na-tioglicolato 0,005M; pH 7,2 (COLARICCIO et al., 1995) para inóculo a partir de folhas sintomáticas de maracujá-amarelo e alfeneiro.

Em um ensaio preliminar foram utilizadas as seguintes plantas-teste: *Antirrhinum majus* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn*., C. quinoa* Willd., *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Hibiscus cannabinus* L., *Ligustrum sinense*, *Nicotiana glutinosa* L., *N. tabacum* L., *Passiflora edulis* f. *flavicarpa, Phaseolus vulgaris* L. cv. UNA e *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Estas plantas foram produzidas e mantidas em condições de casa de vegetação e a inoculação foi feita com auxílio do abrasivo Celite. As avaliações ocorreram a cada dois dias por aproximadamente três semanas. As plantas que apresentaram sintomas da infecção viral foram então submetidas a ensaios de RT-PCR e análises citopáticas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET), para confirmação da presença de PfGSV.

As espécies que apresentaram resultados positivos neste ensaio foram novamente inoculadas, tendo folhas sintomáticas de maracujá e alfeneiro como fontes de inóculo. Foram utilizadas três plantas de cada espécie e as avaliações ocorreram a cada dois dias, durante três semanas, observando-se o surgimento de lesões.

2.2.5 Ensaios de RT-PCR

Para detecção de PfGSV por RT-PCR realizou-se a extração de RNA total dos tecidos sintomáticos retirados das folhas que apresentavam sintomas suspeitos da infecção viral. A extração foi realizada com TRIzol, conforme recomendações do

fabricante (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, realizou-se um protocolo de purificação do RNA extraído para evitar possíveis contaminações com resíduos fenólicos ou proteicos. Para isso, completou-se o volume das amostras para 100 µL com RNAse-Free Water, adicionou-se 30 µL de etanol 100% e 10 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2. Essa mistura foi mantida em freezer -20 °C overnight. Posteriormente, centrifugou-se as amostras a 13.000 rpm por 30 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol 70%. Prosseguiu-se com nova centrifugação utilizando-se a mesma velocidade durante 15 minutos. Esta etapa foi realizada duas vezes, e logo após, descartou-se o sobrenadante e as amostras foram secas a temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este tempo, o pellet formado foi ressuspendido em 20 µL de RNAse-Free Water e armazenado em freezer -80 °C para os posteriores testes de RT-PCR.

Em casos onde a quantidade de tecido lesionado era muito pequena, foi realizada a extração de RNA total com “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tal, o material de interesse foi macerado em nitrogênio líquido e, logo após a maceração, adicionou-se 400 µL de tampão CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e as amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada (4 °C), a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. Na sequência, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste, adicionou-se uma mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após a homogeneização das amostras, o próximo passo foi a incubação das mesmas a 56 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se às amostras 250 µL de etanol absoluto, realizou-se a homogeneização através da agitação em vortex, com posterior incubação das amostras em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram transferidas para as colunas do kit utilizado, que foram submetidas a centrifugação (7.000 rpm por 1 minuto). Logo após, o material filtrado nas colunas foi descartado, adicionou-se 500 µL de wash buffer e realizou-se a centrifugação a 7.000 rpm por 1 minuto. Esta última etapa foi realizada duas vezes e posteriormente, as colunas, sem adição de nenhum reagente, foram centrifugadas à velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. Após isto, adicionou-se 30 µL de RNAse free water às colunas para eluição do RNA extraído. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 minuto, quando então foram centrifugadas a 13.000 rpm também por 1

minuto. Ao final desta etapa obteve-se o RNA total das amostras, que foi armazenado em freezer -80 °C.

Após a extração, 3 µL de cada amostra extraída foram utilizados para síntese de cDNA usando primers hexâmeros aleatórios e o kit “GoScript™ Reverse Transcriptase”, conforme recomendação do fabricante (Promega).

Para realização da PCR foram utilizados 5 µL de “GoTaq® Master Mixes” (Promega), 2,6 µL de Nuclease Free Water, 2 µL do cDNA obtido e 0,2 µL de cada primer utilizado, totalizando volume de 10 µL. Utilizou-se par de primers específico para detecção de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV: RNA2 F: 5’-CGATATTTGATCAATCCGTT-3’ e R: 5’-CACCTTAAAATTCGAGGGTT-3’ (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). A amplificação do fragmento ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 35 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 5 minutos. Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

2.2.6 Análise citopática dos tecidos sintomáticos

A fim de confirmar a presença de PfGSV nos tecidos das lesões observadas, nas plantas inoculadas e coletadas, realizou-se o exame de secções ultrafinas ao MET, de pequenos fragmentos processados conforme descrito por Kitajima e Nome (1999): os tecidos foram fixados em mescla de glutaraldeído/paraformaldeído, pós-fixados com OsO_4, desidratados em gradiente acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; 15 minutos em cada), infiltrados e emblocados em resina epóxica de Spurr. Os blocos foram seccionados em um ultramicrótomo (Leica EM UC6) equipado com navalha de diamante Diatome; as secções foram montadas em retículos de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011, e as imagens registradas digitalmente.

2.3 Resultados e Discussão

Das mais de 160 espécies de plantas inoculadas com ácaros *Brevipalpus* spp. virulíferos, apenas 18 exibiram sintomas da infecção viral, a qual foi comprovada pelas análises realizadas (Tabela 1 e Figuras 2 e 3). Das nove espécies que se apresentavam possivelmente infectadas, todas apresentaram-se infectadas por

PfGSV (Tabela 2 e Figuras 2 e 3). Os sintomas exibidos pelas plantas após a infecção variaram de lesões locais necróticas ou cloróticas a manchas/pintas verdes (Figura 1). A variação de sintomas é justificada pela variabilidade de espécies infectadas, sendo que as mesmas pertencem a diferentes famílias botânicas. Em todas as secções das lesões provenientes da infecção ocasionada por PfGSV analisadas, pode-se observar a presença de viroplasmas e/ou partículas típicas de cilevirus, as quais são baciliformes, curtas (50–70 nm × 100–120 nm) e envelopadas (KITAJIMA et al., 2003) (Figura 2).

Após inoculação mecânica de doze espécies de plantas, utilizando como inóculo folhas sintomáticas de maracujá-amarelo e solução tampão estabelecida por Colarricio et al. (1995), pode-se obter quatro plantas hospedeiras do PfGSV: *A. majus, C. quinoa*, *D. stramonium* e *N. tabacum* (Tabela 3 e Figura 4). *Chenopodium quinoa* apresentou sintomas cinco dias após a inoculação, quando pode-se verificar a presença de inúmeras lesões locais cloróticas nas folhas inoculadas (Figura 1-22). Já *A. majus*, *D. stramonium* e *N. tabacum* apresentaram sintomas mais tardios, com aproximadamente 15 dias após a inoculação, sendo visíveis apenas quando as folhas inoculadas entraram em processo de senescência, evidenciando sintoma típico de PfGSV em maracujazeiro: manchas/pintas verdes (Figura 1-23, 24 e 25). Quando analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão, ambas exibiram partículas virais e viroplasma típicos de cilevirus (KITAJIMA et al., 2003) (Figura 2-R, S, T e U).

Vale destacar que *A. majus*, *D. stramonium* e *N. tabacum* quando inoculadas com ácaros virulíferos não apresentaram sintomas da infecção por PfGSV, o que indica que não são hospedeiras do vetor, mas após inoculação mecânica mostraram-se hospedeiras do vírus. Além disso, *L. sinense*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. vulgaris* cv. UNA e *V. unguiculata* quando inoculadas com ácaros apresentaram sintomas da infecção por PfGSV, no entanto, mecanicamente a transmissão viral não ocorreu, o que aponta que estas plantas são hospedeiras também do vetor e necessitam deste para que ocorra a infecção.

Quando se utilizou folhas sintomáticas de *L. sinense* como fonte de inóculo para as inoculações mecânicas, nenhuma das plantas-teste apresentou sintomas. Isto pode ter ocorrido devido a uma baixa concentração viral nas folhas de alfeneiro utilizadas, ou mais provavelmente, pela presença de substâncias inibidoras, e neste caso, outras soluções tampão podem ser testadas.

Alguns dos gêneros aqui analisados, cujas espécies foram comprovadas como hospedeiras de PfGSV, já apresentavam relatados na literatura com infecção ocasionada por VTB, como o caso de *Ligustrum* sp., *Brunfelsia* sp., *Hibiscus* sp.; *Schefflera* sp., *Hedera* sp.; *Perlargonium* sp.; *Cestrum* sp., entre outros (KITAJIMA et al., 2010; 2017; SAITO, 2020; COSTA-RODRIGUES et al., 2022).

Assim, no total, 31 espécies mostraram-se suscetíveis à infecção pelo PfGSV (Figura 1). No entanto, este número pode ser maior, tendo em vista que a colônia de ácaros utilizada não se tratava de colônia isolinha, portanto, havia mistura de espécies e sabe-se que a única espécie reconhecida como vetora deste vírus, até o momento, é *B. yothersi* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LILLO et al., 2021). Ademais, alguns dos ácaros podem não ter se alimentado das lesões na fonte de inóculo e não terem adquirido o vírus, além do estresse que os mesmos sofrem durante a montagem do experimento, interferindo em sua capacidade de transmissão (TASSI et al., 2017). Além disso, em experimento preliminar realizado por Saito (2020), pode-se verificar que a lista de hospedeiras deste vírus abrange outras espécies, algumas não testadas neste experimento, como *Ligustrum ovalifolium* Hassk. e *Passiflora morifolia* Masters, e outras que puderam ser aqui comprovadas através de RT-PCR, como *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don e *N. tabacum*.

Pode-se verificar que PfGSV não tem uma gama de hospedeiros experimentais tão extensa quanto CiLV-C (GARITA et al., 2014). No entanto, PfGSV apresenta gama maior de hospedeiros naturais, pelo menos nove espécies confirmadas, enquanto que CiLV-C foi relatado infectando naturalmente apenas duas espécies não cítricas: *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. e *Commelina benghalensis* L. (LÉON et al., 2006; NUNES et al., 2012).

Conhecer a gama de hospedeiros de um determinado patógeno contribui para o entendimento de sua epidemiologia e para elaboração de um manejo eficiente da doença, tendo em vista que se pelo menos uma das espécies que hospedem este patógeno estiver presente na área de cultivo, ela servirá de fonte de inóculo para o início da doença na cultura de interesse. Aliado a estes fatores, esta informação torna-se relevante também para que se possa evitar a introdução deste vírus em novas áreas, sabendo-se que PfGSV apresenta-se restrito a alguns estados do território brasileiro (KITAJIMA et al., 2003; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

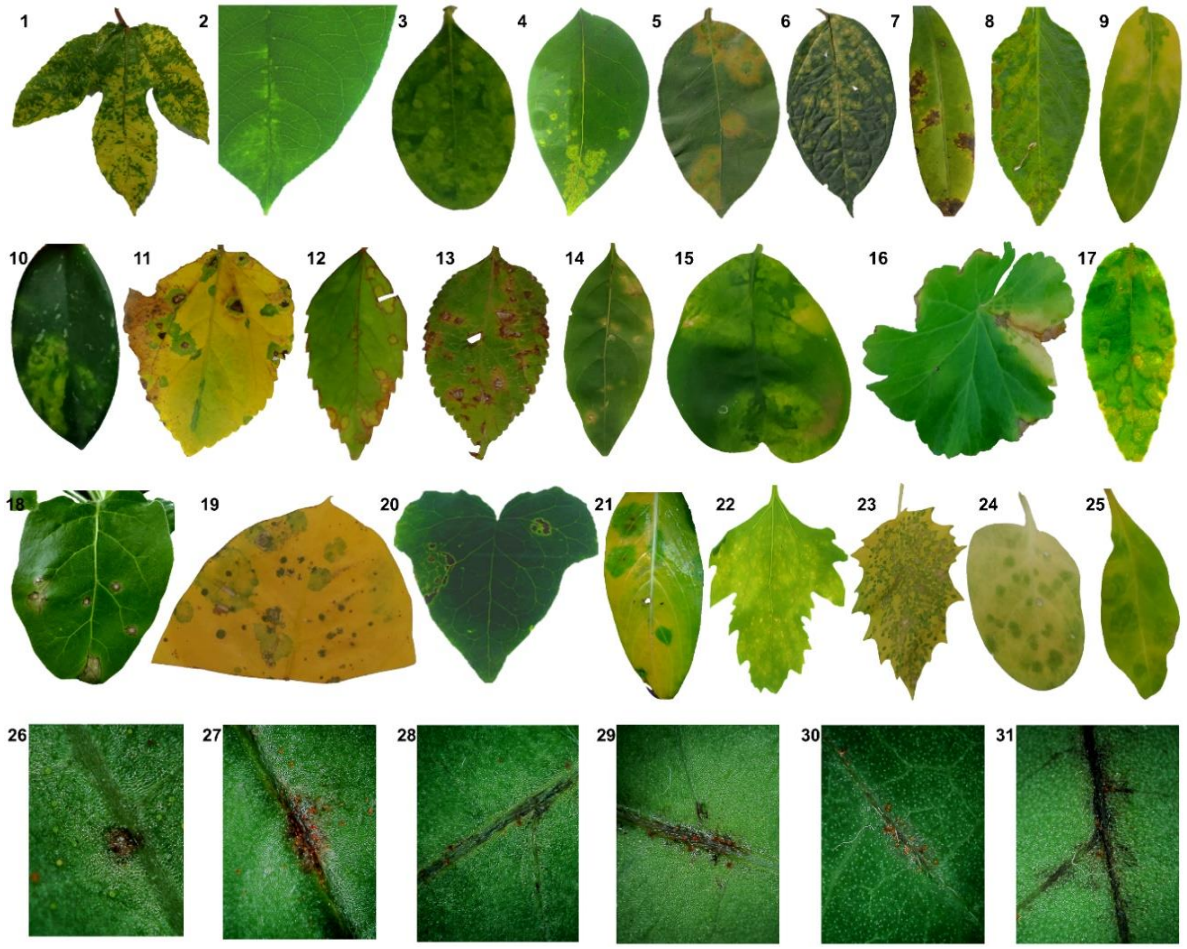
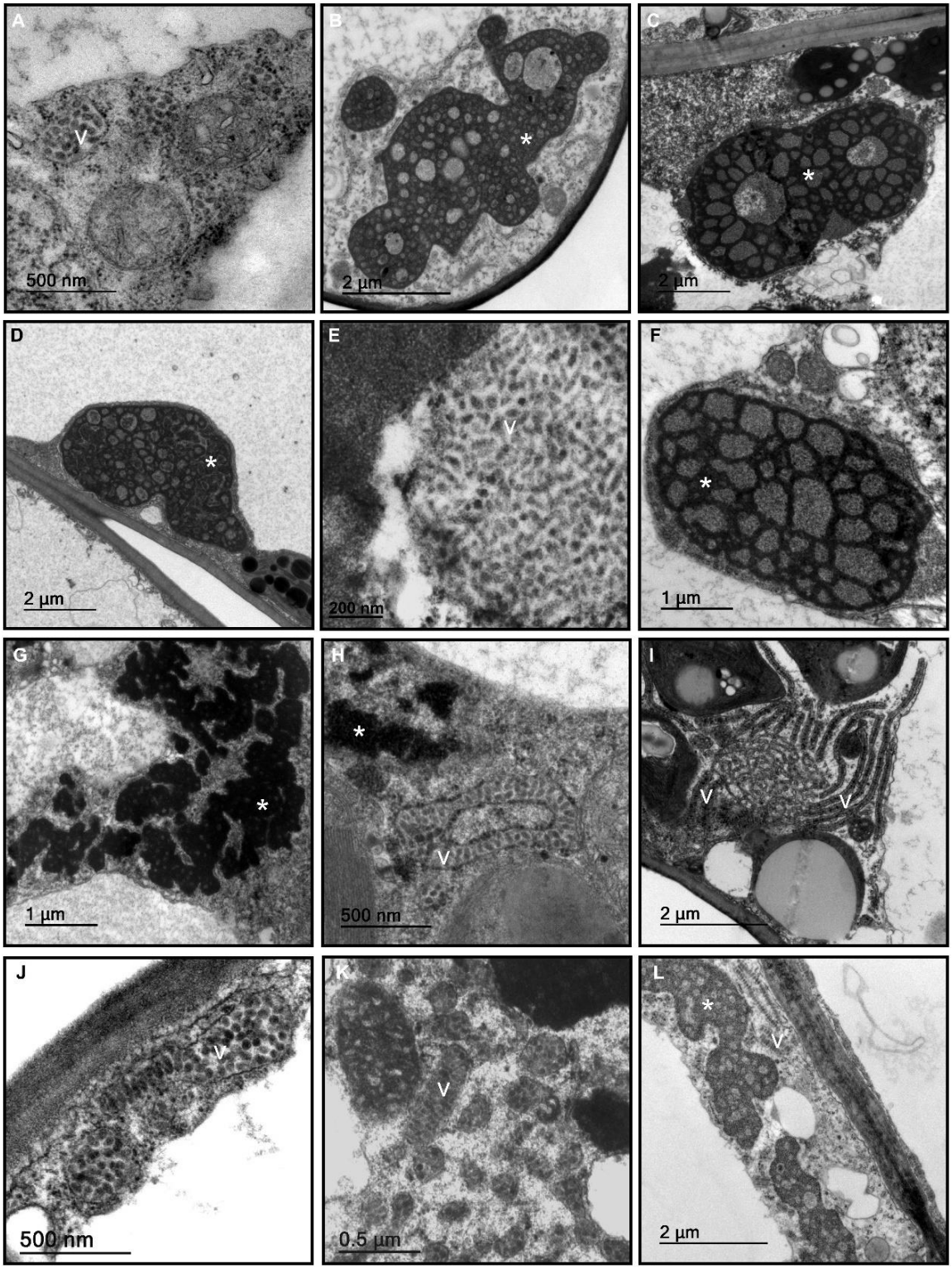


Figura 1: Imagens de folhas de diferentes espécies de plantas com sintomas da infecção ocasionada por PfGSV. **1, 8, 9, 11, 16, 19, 21, 23, 24 e 25-** folhas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Capsicum annuum* Group, *Lonicera japonica*, *Hibiscus sinensis*, *Pelargonium* sp., *Schefflera arboricola*, *Catharanthus roseus*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* e *Antirrhinum majus,* respectivamente, com manchas/pintas verdes; **2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 14, 15, 17, 20 e 22-** folhas de *P. alata*, *Ligustrum sinense, L. lucidum*, *L. japonicum*, *Clerodendrum thomsoniae, Hoya carnosa*, *H. schizopetalus*, *Cestrum nocturnum*, *Brunfelsia uniflora*, *Malvaviscus arboreus, Hedera helix* e *Chenopodium quinoa*, respectivamente, com lesões locais cloróticas; **7-** folha de *Allamanda cathartica* com lesões locais necróticas circundadas por halo amarelo; **13, 18, 26, 27, 28, 29, 30 e 31**- folhas de *Lantana camara*, *N. megalosiphon*, *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* var. Jalo, *Dolichos lablab*, *Mucuna pruriens* e *Phaseolus vulgaris* cv. UNA, respectivamente, com lesões locais necróticas.


A
V
500 nm
B
*
2 µm
C
*
2 µm
D
*
2 µm
E
V
200 nm
F
*
1 µm
G
*
1 µm
H
*
V
500 nm
I
V
V
2 µm
J
V
500 nm
K
V
0.5 µm
L
*
V
2 µm

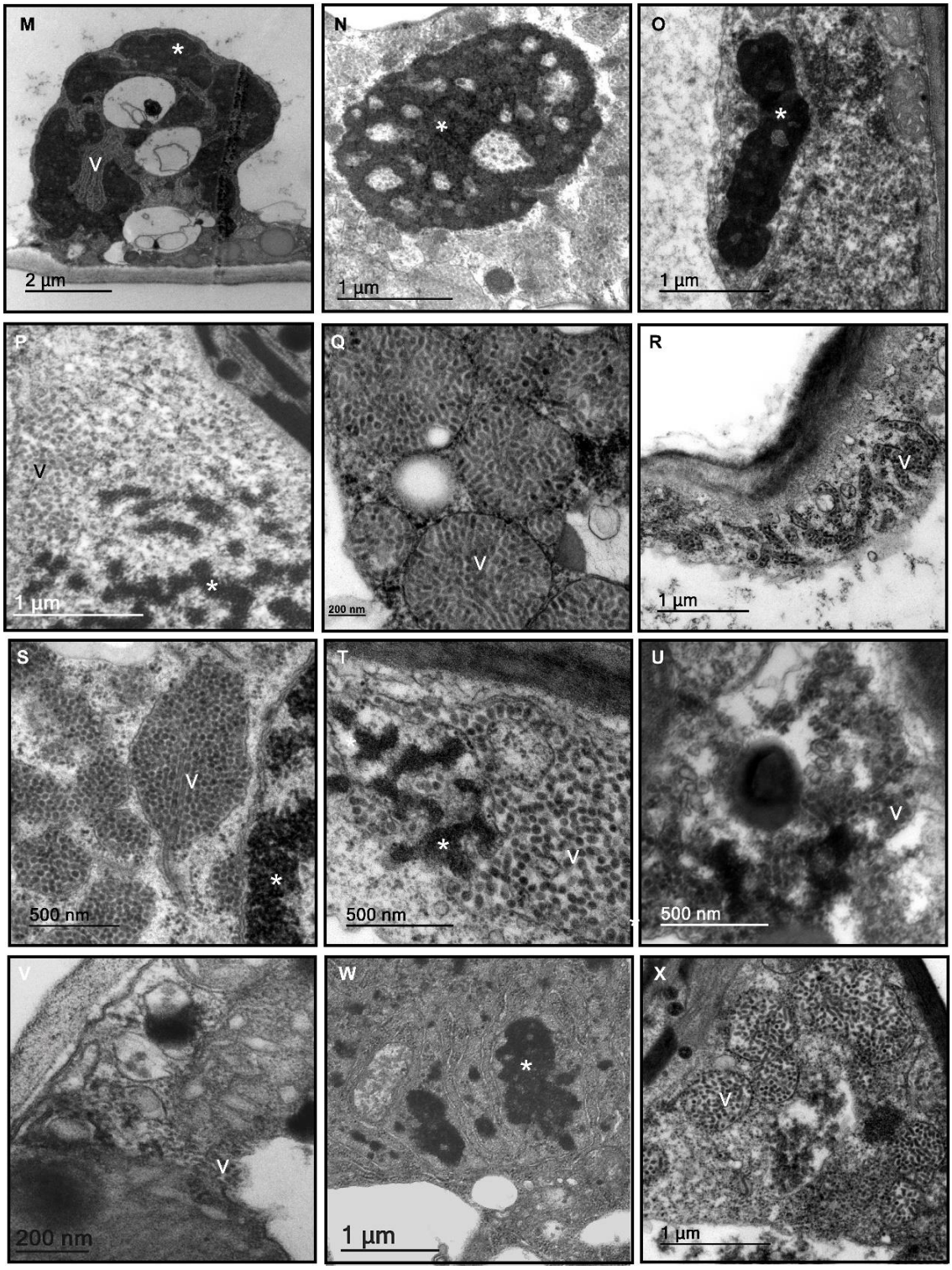


Figura 2: Micrografias eletrônicas de transmissão das alterações celulares induzidas pela infecção de PfGSV em diferentes espécies hospedeiras. **A-** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; **B-** *P. alata*; **C-** *Ligustrum sinense*; **D-** *L. lucidum*; **E-** *L. japonicum*; **F-** *Capsicum annuum* Group; **G-** *Lonicera japonica*; **H-** *Hoya carnosa*; **I-** *Hibiscus sinensis*; **J-** *H. schizopetalus*; **K-** *Cestrum nocturnum*; **L-** *Brunfelsia uniflora*; **M-** *Pelargonium* sp.; **N-** *Malvaviscus arboreus*; **O-** *Schefflera arboricola*; **P-** *Hedera helix*; **Q-** *Catharanthus roseus*; **R-** *Chenopodium quinoa*; **S-** *Datura stramonium*; **T-** *Nicotiana tabacum*; **U-** *Antirrhinum majus*; **V-** *Vigna unguiculata*; **W-** *Dolichos lablab*; **X-** *Phaseolus vulgaris* cv. UNA. V: partículas virais; *viroplasma.

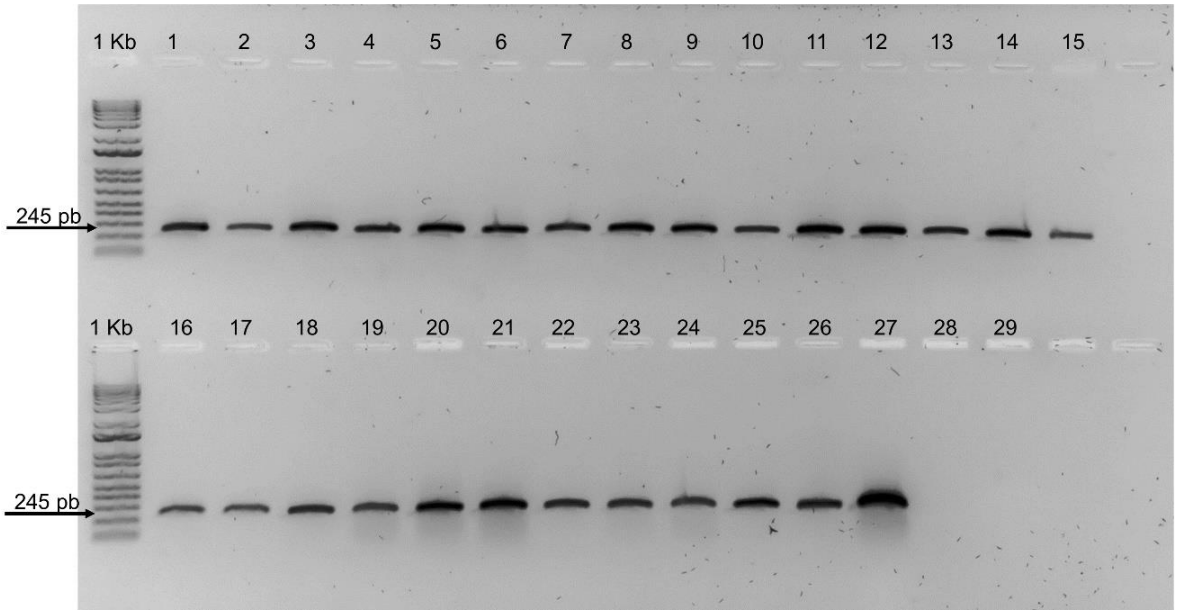


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em folhas sintomáticas de diferentes espécies. Coluna 1: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Coluna 2: *P. alata*; Coluna 3: *Ligustrum sinense*; Coluna 4: *L. lucidum*; Coluna 5: *L. japonicum*; Coluna 6: *Lonicera japonica*; Coluna 7: *Allamanda cathartica*; Coluna 8: *Malvaviscus arboreus*; Coluna 9: *Catharanthus roseus*; Coluna 10: *Hibiscus schizopetalus*; Coluna 11: *Hibiscus sinensis*; Coluna 12: *Cestrum nocturnum*; Coluna 13*: Lantana camara*; Coluna 14: *Schefflera arboricola*; Coluna 15: *Hoya carnosa*; Coluna 16: *Brunfelsia uniflora*; Coluna 17: *Clerodendrum thomsoniae*; Coluna 18: *Nicotiana megalosiphon*; Coluna 19: *Hedera helix*; Coluna 20: *Pelargonium* sp.; Coluna 21: *Capsicum annuum* Group; Coluna 22: *Dolichos lablab*; Coluna 23: *Vigna unguiculata*; Coluna 24: *Phaseolus vulgaris* cv. UNA; Coluna 25: *Mucuna pruriens*; Coluna 26: *Cajanus cajan*; Coluna 27: *Phaseolus vulgaris* var. Jalo; Coluna 28: controle dos reagentes da PCR; Coluna 29: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

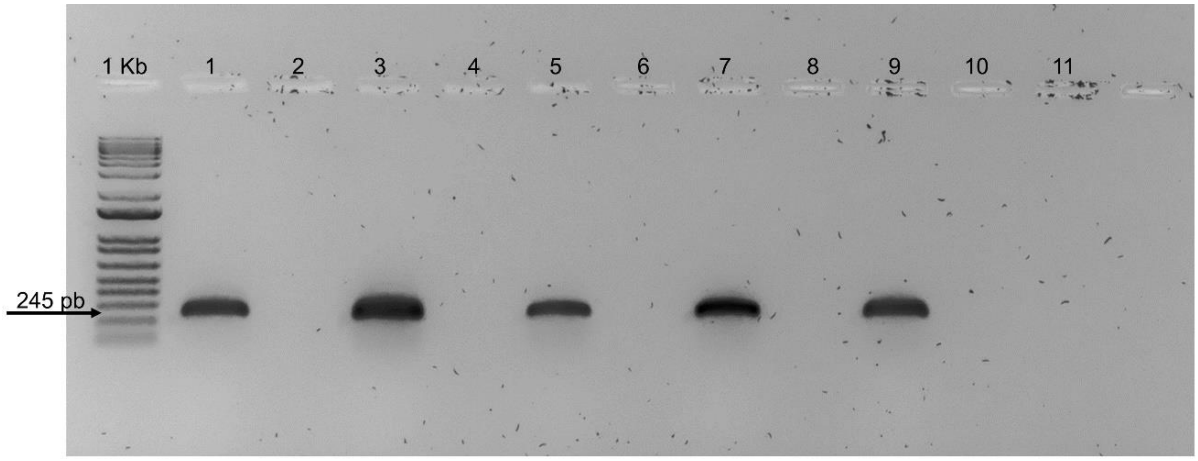


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em folhas sintomáticas de diferentes espécies, após inoculação mecânica com extrato vegetal contendo PfGSV. Coluna 1: controle positivo, folhas sintomáticas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* utilizadas como fonte de inóculo; Colunas 2, 4, 6 e 8: controles negativos, folhas assintomáticas de *Chenopodium quinoa*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* e *Antirrhinum majus*, respectivamente, inoculadas apenas com solução tampão; Colunas 3, 5, 7 e 9: folhas sintomáticas de *C. quinoa*, *D. stramonium*, *N. tabacum* e *A. majus,* após inoculação mecânica com extrato vegetal contendo PfGSV; Coluna 10: controle dos reagentes da PCR; Coluna 11: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Tabela 1: Lista de plantas infestadas com ácaros *Brevipalpus* spp. virulíferos, para determinação das espécies hospedeiras de passion fruit green spot virus.

	Hospedeira	Sintoma	PCR	MET		Hospedeira	Sintoma	PCR	MET
1	*Ageratum houstonianum* Mill.	-	-	-	**24**	*Callopsis* sp.	-	-	-
2	*Allamanda cathartica* L.	-	-	-	**25**	*Camellia* sp.	-	-	-
3	*Amaranthus* sp.	-	-	-	**26**	*Canavalia ensiformis* L.	-	-	-
4	*Annona muricata* Linn.	-	-	-	**27**	*Capsicum annuum* L. Group	MV	+	+
5	*Annona squamosa* Linn.	-	-	-	**28**	*Capsicum baccatum* L.	-	-	-
6	*Antirrhinum majus* L.	-	-	-	**29**	*Carica papaya* L.	-	-	-
7	*Apium graveolens* L.	-	-	-	**30**	*Cataranthus roseus* L.	MV	+	+
8	*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh	-	-	-	**31**	*Celosia argentea* L.	-	-	-
9	*Arachis hypogaea* L.	-	-	-	**32**	*Centaurea cyanus* L.	-	-	-
10	*Aristolochia* sp.	-	-	-	**33**	*Centella asiática* (L.) Urb.	-	-	-
11	*Avena sativa* L. cv. BRS Neblina	-	-	-	**34**	*Cestrum nocturnum* L.	-	-	-
12	*Barleria cristata* Linn.	-	-	-	**35**	*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.	-	-	-
13	*Bellis perennis* L.	-	-	-	**36**	*Chrysanthemum* sp.	-	-	-
14	*Beta vulgaris* L.	-	-	-	**37**	*Cichorium intybus* L.	-	-	-
15	*Beta vulgaris* var. *cicla*	-	-	-	**38**	*Cichorium intybus* L. var. *intybus*	-	-	-
16	*Brassica oleracea* L. var. *capitata*	-	-	-	**39**	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck	-	-	-
17	*Brassica rapa* L.	-	-	-	**40**	*Clerodendrum speciosum* L.	-	-	-
18	*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*	-	-	-	**41**	*Clerodendrum thomsoniae* Balf.	-	-	-
19	*Brassica rapa* subsp. *rapa*	-	-	-	**42**	*Cobea scandens* Cav.	-	-	-
20	*Brugmansia* sp.	-	-	-	**43**	*Coffea arabica* L.	-	-	-
21	*Brunfelsia uniflora* (Pohl) D. Don	LLc	+	+	**44**	*Colocasia* spp.	-	-	-
22	*Cajanus cajan* (L.) Millsp.	LLn	+	nt	**45**	*Commelina benghalensis* Linn.	-	-	-
23	*Calendula officinalis* L.	-	-	-	**46**	*Cordyline terminalis* Kunth.	-	-	-

47	*Coriandrum sativum* L.	-	-	-	**73**	*Hedera helix* L.	LLn	+	+
48	*Cosmos bipinnatus* Cav.	-	-	-	**74**	*Helianthus annuus* L.	-	-	-
49	*Cosmos* sp.	-	-	-	**75**	*Hibiscus cannabinus* L.	-	-	-
50	*Crotalaria breviflora* DC.	-	-	-	**76**	*Hibiscus sinensis* Linn.	MV	+	+
51	*Crotalaria juncea* L.	-	-	-	**77**	*Hoya carnosa* (L.) R. Br.	LLc	+	+
52	*Crotalaria spectabilis* Roth	-	-	-	**78**	*Impatiens balsamina* L.	-	-	-
53	*Cucumis anguria* L.	-	-	-	**79**	*Ipomea purpurea* (L.) Roth.	-	-	-
54	*Cucumis sativus* L.	-	-	-	**80**	*Ipomoea batatas* (L.) Lam.	-	-	-
55	*Cynara scolymus* L.	-	-	-	**81**	*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.	-	-	-
56	*Datura stramonium* L.	-	-	-	**82**	*Lactuca sativa* L.	-	-	-
57	*Daucus carota* L. subsp. *sativus*	-	-	-	**83**	*Lavatera trimestris* L.	-	-	-
58	*Dendrobium* sp.	-	-	-	**84**	*Leucanthemum vulgare* Lam.	-	-	-
59	*Dhalia* sp.	-	-	-	**85**	*Ligustrum lucidum* Ait.	-	-	-
60	*Dieffenbachia seguinte* (Jacq.) Schott.	-	-	-	**86**	*Ligustrum sinense* Lour.	LLc	+	+
61	*Digitalis* sp.	-	-	-	**87**	*Limonium sinuatum* (L.) Mill.	-	-	-
62	*Dolichos lablab* L.	LLn	+	+	**88**	*Lippia alba* (Mill.) NE Brown	-	-	-
63	*Dracaena reflexa* Lam.	-	-	-	**89**	*Lobularia maritima* (L.) Desv.	-	-	-
64	*Emilia fosbergii* Nicolson	-	-	-	**90**	*Lonicera japonica* Thunb.	MV	+	+
65	*Epidendrum* sp.	-	-	-	**91**	*Lupinus albus* L.	-	-	-
66	*Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Miller) Thell	-	-	-	**92**	*Malvaviscus arboreus* Cav.	LLc	+	+
67	*Eschscholzia californica* Cham.	-	-	-	**93**	*Mammillaria elongata* DC	-	-	-
68	*Eugenia uniflora* L.	-	-	-	**94**	*Manihot esculenta* Crantz	-	-	-
69	*Fuchsia hybrida* L. 'La Campanella'	-	-	-	**95**	*Matthiola incana* (L.) R. Br.	-	-	-
70	*Glycine max* (L.) Merrill	-	-	-	**96**	*Mentha spicata* L.	-	-	-
71	*Gossypium hirsutum* L.	-	-	-	**97**	*Mirabilis jalapa* L.	-	-	-
72	*Gypsophila paniculata* L.	-	-	-	**98**	*Mucuna pruriens* (L.) DC.	LLn	+	nt

99	*Nasturtium officinale* R. Br.	-	-	-	**124**	*Portulaca oleracea* L.	-	-	-
100	*Nicandra physaloides* (L.) Gaertn.	-	-	-	**125**	*Psidium guajava* L.	-	-	-
101	*Nicotiana benthamiana* Domin.	-	-	-	**126**	*Pyrethrum sp.*	-	-	-
102	*Nicotiana glauca* Grah.	-	-	-	**127**	*Raphanus sativus* L.	-	-	-
103	*Nicotiana glutionosa* L.	-	-	-	**128**	*Rheum rhabarbarum* L.	-	-	-
104	*Nicotiana megalosiphon* Van Heurck & Muell. Arg.	LLn	+	nt	**129**	*Rubus idaeus* L.	-	-	-
105	*Nicotiana tabacum* L.	-	-	-	**130**	*Sedum sp.*	-	-	-
106	*Ocimum basilicum* L.	-	-	-	**131**	*Sesamum indicum* L.	-	-	-
107	*Oncidium sp.*	-	-	-	**132**	*Sida rhombifolia* L.	-	-	-
108	*Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg.	MV	+	+	**133**	*Sinapis alba* L.	-	-	-
109	*Passiflora foetida* L.	-	-	-	**134**	*Solanum aethiopicum* (L.) ‘Gilo group’	-	-	-
110	*Passiflora suberosa* L.	-	-	-	**135**	*Solanum lycopersicum* L.	-	-	-
111	*Pelargonium sp.*	MV	+	+	**136**	*Solanum melongena* L.	-	-	-
112	*Persea americana* Mill	-	-	-	**137**	*Solanum nigrum* Linn.	-	-	-
113	*Petroselinum crispum* L.	-	-	-	**138**	*Solanum violaefolium* Schott.	-	-	-
114	*Petunia x hybrida* Vilm.	-	-	-	**139**	*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd	-	-	-
115	*Peumus boldus* Molina	-	-	-	**140**	*Solenostemon sp.*	-	-	-
116	*Phaseolus vulgaris* L. var. Jalo	LLn	+	nt	**141**	*Spinacea oleracea* L.	-	-	-
117	*Phaseolus vulgaris* cv. TRM	-	-	-	**142**	*Syzygium aromaticum* L.	-	-	-
118	*Phaseolus vulgaris* cv. UNA	LLn	+	+	**143**	*Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze	-	-	-
119	*Phisalis peruviana* L.	-	-	-	**144**	*Theobroma cacao* Linn.	-	-	-
120	*Phlox drummondii* Hook.	-	-	-	**145**	*Thunbergia erecta* Retz.	-	-	-
121	*Pisum sativum* L. var. saccharatum	-	-	-	**146**	*Thunbergia grandiflora* Roxb.	-	-	-
122	*Plumbago auriculata* Lam.				**147**	*Tithonia diversifolia* Hemsl.	-	-	-
123	*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.	-	-	-	**148**	*Triticum sp.* cv. BRS Guamirim	-	-	-

149	*Tropaeolum majus* L.	-	-	-	**157**	*Vigna unguiculata* cv. Canapun	-	-	-
150	*Vasconcellea* sp.	-	-	-	**158**	*Vigna unguiculata* cv. Gorgeia	-	-	-
151	*Vicia faba* L.	-	-	-	**159**	*Vinca minor* L.	-	-	-
152	*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi	-	-	-	**160**	*Viola odorata* L.	-	-	-
153	*Vigna unguiculata* (L.) Walp.	LLn	+	+	**161**	*Viola tricolor* L.	-	-	-
154	*Vigna unguiculata* cv. Branquinho	-	-	-	**162**	*X Triticosecale* Wittmack cv. BRS Surubim	-	-	-
155	*Vigna unguiculata* cv. BRS Itaim	-	-	-	**163**	*Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.	-	-	-
156	*Vigna unguiculata* cv. BRS Tumucumaque	-	-	-	**164**	*Zinnia elegans* L.	-	-	-

PCR: Polimerase Chain Reaction; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; LLn: lesão local necrótica; LLc: lesão local clorótica; MV: mancha verde; nt: não testado; +: positivo; -: negativo.

Tabela 2: Lista de plantas naturalmente infectadas por passion fruit green spot virus.

	Hospedeira	Sintoma	PCR	MET
1	*Allamanda cathartica* L.	LLn	+	nt
2	*Cestrum nocturnum* L.	LLc	+	+
3	*Clerodendrum thomsoniae* Balf.	LLc	+	nt
4	*Hibiscus schizopetalus* (Mast) Hook	LLc	+	+
5	*Lantana câmara* Linn.	LLn	+	nt
6	*Ligustrum japonicum* Thunb.	LLc	+	+
7	*Ligustrum lucidum* Ait.	LLc	+	+
8	*Passiflora alata* Curtis	LLc	+	+
9	*Schefflera arboricola* Hayata	MV	+	+

PCR: Polimerase Chain Reaction; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; LLn: lesão local necrótica; LLc: lesão local clorótica; MV: mancha verde; nt: não testado; +: positivo.

Tabela 3: Lista de plantas inoculadas mecanicamente com extrato de folhas de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* infectadas com passion fruit green spot virus, para determinação das espécies hospedeiras deste vírus.

	Hospedeira	Sintoma	PCR	MET
1	*Antirrhinum majus* L.	MV	+	+
2	*Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn.	-	-	-
3	*Chenopodium quinoa* Willd.	LLc	+	+
4	*Datura stramonium* L.	MV	+	+
5	*Gomphrena globosa* L.	-	-	-
6	*Hibiscus cannabinus* L.	-	-	-
7	*Ligustrum sinense* Lour.	-	-	-
8	*Nicotiana glutinosa* L.	-	-	-
9	*Nicotiana tabacum* L.	MV	+	+
10	*Passiflora* Sims *edulis* f. *flavicarpa* Deg.	-	-	-
11	*Phaseolus vulgaris* L. cv. UNA	-	-	-
12	*Vigna unguiculata* (L.) Walp.	-	-	-

PCR: Polimerase Chain Reaction; MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão; LLc: lesão local clorótica; MV: mancha verde; +: positivo; -: negativo.

2.4 Conclusão

Pode-se obter 31 espécies hospedeiras de PfGSV, sendo 18 obtidas da infecção experimental com ácaros virulíferos, 4 através de inoculação mecânica e 9 naturalmente infectadas. Estes dados indicam que PfGSV tem potencial para infectar um grande número de plantas, que podem servir como fonte de inóculo para aquelas cultivadas.

Foi possível realizar a transmissão mecânica de PfGSV, de maneira consistente, para quatro espécies de plantas, quando se utilizou folhas sintomáticas de maracujá-amarelo como fonte de inóculo.

Referências

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

COSTA-RODRIGUES, M.; PEREIRA, L.R.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; TASSI, A.D.; LEÃO, I.G.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. First reporto f passion fruit green spot infecting hibiscos plants. **New Disease Reports.** Aceito para publicação. 2022.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

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

GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; ROMÃO, G.O.; KITAJIMA, E.W. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 27–39, 2014.

KITAJIMA, E.; NOME, C. Microscopia electronica em virologia vegetal. In: Campo DM, Lenardon SL (eds) **Métodos para detectar patógenos sistêmicos.** Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Córdoba, p. 59–86, 1999.

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

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

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

KITAJIMA, E.W.; TASSI, A.D.; SAITO, M.S.G.; SALAROLI, R.B.; CHABI-JESUS, C.; FREITAS-ASTÚA, J. Novas espécies hospedeiras do vírus da leprose do ligustro (*Ligustrum* leprosis virus-LigLV). **Anais do XL Congresso Paulista de Fitopatologia**, Campinas. 2017.

LEÓN, G.A.; REALPE, C.E.; GARZON, P.; RODRIGUEZ, J.A.; MORENO, M.G.; CHILDERS, C.C.; ACHOR, D.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease**, v. 90, p. 682, 2006.

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

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 16 p., 2020.

SAITO, M.S.G. **O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREISTAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v.71, p. 227-241, 2017.

3 DETERMINAÇÃO DE PLANTA INDICADORA PARA ESTUDOS COM *Passion fruit green spot virus* E POSSIBILIDADE DE DETECÇÃO DESTE VÍRUS EM FOLHAS AINDA VERDES DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

Resumo

O Brasil é o maior produtor de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) do mundo, sendo o maracujá-amarelo (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) a espécie mais cultivada. A produção desta fruta vem crescendo nos últimos anos, no entanto, alguns fatores podem limitar a expansão da cultura, como o aparecimento de doenças de difícil controle, como as viroses. Uma das viroses que incidem sobre a cultura é a pinta verde do maracujazeiro, ocasionada por passion fruit green spot virus (PfGSV), que no passado foi capaz de destruir pequenos pomares devido à alta incidência. Os sintomas da infecção de PfGSV nas plantas de maracujá só são visíveis quando as folhas entram em senescência e os frutos em processo de amadurecimento, o que pode demorar alguns meses. Esta demora para observação de sintomas dificulta o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este patossistema. Visando facilitar estudos futuros com este vírus, procurou-se encontrar uma planta indicadora de fácil produção e que apresente resultados em um curto período de tempo, além de verificar a possibilidade de as folhas de maracujá estarem infectadas mesmo sem exibir sintomas. Foram inoculadas diferentes espécies de leguminosas e variedades de feijoeiro, visando identificar uma planta-teste para uso como indicadora da infecção ocasionada por PfGSV, além de realizar a inoculação de plântulas de maracujá e a cada sete dias coletar e verificar, através de testes moleculares, a possibilidade de infecção das folhas mesmo sem que apresentassem sintomas da infecção viral. Das oito plantas testadas, *Dolichos lablab* L. mostrou-se a melhor opção para uso como planta indicadora da infeção de PfGSV, apresentando 100% de eficiência para esta finalidade. Além disso, foi possível a detecção de PfGSV, através de RT-PCR, em folhas de maracujá assintomáticas a partir da primeira coleta, aos sete dias após a inoculação das plantas.

Palavras-chave: Pinta verde do maracujazeiro, *Dolichos lablab*, Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

Abstract

Brazil is the largest producer of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) in the world, with yellow passion fruit (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) being the most cultivated species. The production of this fruit has been growing in recent years, however, some factors may limit the expansion of the crop, such as the emergence of difficult-to-control diseases, as caused by viruses. One of the viruses that affect the culture is the passion fruit green spot virus (PfGSV), which in the past was able to destroy small orchards due to its high incidence. The symptoms of PfGSV infection in passion fruit plants are only visible when the leaves enter senescence and the fruits are in the process of ripening, which can take a few months. This delay in the observation of symptoms hampers the development of research related to this pathosystem. In order to facilitate future studies with this virus, a search was made to

find an indicator plant that is easy to produce and that presents results in a short period of time. Additionally the possibility of passion fruit leaves being infected even without showing symptoms was investigated. For this, different leguminous species and bean varieties were inoculated, to identify a test plant to be uses as an indicator of infection caused by PfGSV. Also, passion fruit seedlings were mite-inoculated, and every seven days leaf samples were collected and the possibility of symptomless leaf infection by PfGSV was tested by molecular tests. Of the eight plants tested, *Dolichos lablab* L. proved to be the best option for use as an indicator plant for PfGSV infection, showing 100% efficiency for this purpose. In addition, it was possible to detect PfGSV through RT-PCR in asymptomatic passion fruit leaves from the first collection, seven days after plant inoculation.

Keywords: Passion fruit green spot, *Dolichos lablab*, *Brevipalpus*-Transmitted Viruses, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

3.1 Introdução

Passion fruit green spot virus (PfGSV), pertence ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). Embora seja ele de caracterização recente, a doença ocasionada por este vírus, a pinta verde do maracujazeiro, tem seu primeiro relato datado de 1997 no estado de São Paulo, onde ocasionou a destruição de alguns pomares na região do município de Vera Cruz (KITAJIMA et al., 1997). Até o momento, este vírus apresenta distribuição restrita a alguns estados brasileiros (KITAJIMA et al., 2003; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) não havendo ainda relato do mesmo em outros países. Assim como os demais cilevirus, o PfGSV é transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus*, sendo, até o momento, *B. yothersi* Baker a única espécie reconhecida como vetora deste vírus (DE LILLO et al., 2021).

A observação dos sintomas ocasionados por PfGSV em seu hospedeiro principal, o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.), só é possível quando os frutos se encontram em processo de amadurecimento e as folhas em processo de senescência. Em ambos os órgãos, o sintoma característico são manchas/pintas verdes. No entanto, as plantas infectadas podem também apresentar lesões necróticas nos caules (KITAJIMA et al., 1997; 2003). É frequente a observação de viroplasmas e partículas virais baciliformes curtas (50–70 nm×100–120 nm) no citoplasma das células infectadas, quando o tecido sintomático é analisado através de microscopia eletrônica de transmissão (KITAJIMA et al., 2003). Assim como os demais vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB), PfGSV não parece se movimentar sistemicamente na planta, mantendo-se restrito ao ponto de alimentação do vetor.

O longo período para que seja possível a visualização dos sintomas no hospedeiro principal, tendo em vista que é necessário esperar o processo de senescência das folhas, acaba dificultando o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este vírus. Com isso, sabendo-se que plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), de diferentes cultivares, apresentam-se suscetíveis a infecção de CiLV-C (*Citrus leprosis virus C*), espécie-tipo do gênero *Cilevirus*, reagindo com lesões necróticas em poucos dias após a inoculação com ácaros virulíferos (GROOT; FREITAS-ASTÚA; KITAJIMA, 2006; GARITA et al., 2013), o presente trabalho teve como objetivo investigar outras leguminosas e variedades de feijoeiro para encontrar uma indicadora confiável para estudos com PfGSV. Paralelamente, foi avaliada a presença de PfGSV em folhas de plântulas de maracujá, experimentalmente infectadas por ácaros virulíferos, sem que as mesmas exibissem sintomas, através de ensaios de RT-PCR.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Colônia de *Brevipalpus yothersi*

Utilizou-se no presente trabalho colônia isolinha de *B. yothersi*, previamente identificada de acordo com Beard et al. (2015), que já se encontrava estabelecida para implantação destes experimentos. Os ácaros foram mantidos em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) em folhas destacadas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC).

3.2.2 Fonte de inóculo

Utilizou-se como fonte de inóculo do vírus PfGSV folhas de alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) com sintomas típicos da infecção por este vírus (manchas ou anéis cloróticos), coletadas em parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba – SP. Optou-se por utilizar o isolado de *L. sinense*, devido a infecção de alfeneiros pelo PfGSV ser frequente, e assim pode-se sempre dispor de inóculo para os experimentos; os ácaros utilizados nos ensaios alimentaram-se bem nesta hospedeira; os sintomas da infecção por este vírus em maracujá-amarelo só são visíveis quando a folha se encontra em processo de senescência, o que inviabiliza a alimentação dos ácaros nesta fonte de inóculo por mais de dois dias. Além disso, em ensaios prévios pode-se observar que os ácaros utilizados não se adaptam bem às folhas sintomáticas de maracujá; sabe-se, pelos sequenciamentos realizados

anteriormente, que este vírus que infecta alfeneiro corresponde ao isolado BSB1 (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) que apresenta alta similaridade (RNA1 > 99,1% e RNA2 > 97,3%) com o isolado Snp1 de PfGSV, tido como referência para o vírus.

A presença do vírus na fonte de inóculo foi comprovada por ensaios prévios de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), usando iniciadores específicos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

3.2.3 Determinação de planta indicadora

Diferentes espécies de leguminosas foram avaliadas, visando encontrar a melhor planta indicadora para testes futuros com PfGSV. A lista de plantas testadas encontra-se descrita na Tabela 1.

As plantas foram produzidas e mantidas em casa de vegetação, até que o primeiro par de folhas estivesse expandido. Neste momento, as folhas foram destacadas e montadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido.

Um grande grupo de ácaros de uma colônia isolinha de *B. yothersi* foi transferido para folhas sintomáticas de alfeneiro, onde permaneceram por 72 horas para aquisição do vírus. Decorrido este período, grupos de 15 ácaros possivelmente virulíferos foram transferidos para as folhas destacadas das plantas-teste. As folhas foram então mantidas em condições de laboratório durante sete dias, quando foram avaliadas quanto ao surgimento ou não de lesões locais necróticas. A avaliação ocorreu através da observação das folhas em microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, para que fosse possível verificar a presença de lesões, mesmo que pequenas e iniciais. As imagens obtidas nesta etapa foram registradas digitalmente. Todas as folhas foram fotografadas com câmera digital e àquelas que apresentaram sintomas da infecção viral tiveram os pedaços de tecido próximos às lesões removidos, armazenados em freezer -80 °C e posteriormente, submetidos a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos. O teste de RT-PCR foi realizado com um pool de lesões.

O experimento foi realizado em triplicata, com 15 folhas por repetição.

Tabela 1: Espécies de plantas utilizadas neste estudo para determinação de planta indicadora da infecção ocasionada por passion fruit green spot virus.

	Plantas Testadas	Nome Popular
1	*Phaseolus vulgaris* L. cv. UNA	Feijão UNA
2	*Vicia faba* L.	Feijão fava
3	*Vigna unguiculata* (L.) Walp.	Caupi
4	*Dolichos lablab* L.	Lablab
5	*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek	Feijão mungu
6	*Mucuna pruriens* (L.) DC	Mucuna preta
7	*Cajanus cajan* (L.) Millsp.	Feijão guandú
8	*Phaseolus vulgaris* L. var. Jalo	Feijão Jalo

3.2.4 Detecção de PfGSV em folhas verdes de maracujá-amarelo

Sabe-se que os sintomas da infecção de PfGSV em folhas de maracujá são visíveis apenas quando a folha se encontra em processo de senescência. Certamente PfGSV se replica e se acumula na folha de maracujazeiro inoculado, mesmo na fase assintomática. Procurou-se verificar a partir de quanto tempo após a inoculação, seria este vírus detectado na folha inoculada.

Para isto, foram utilizadas plântulas de maracujá-amarelo, produzidas e mantidas em casa de vegetação até que o primeiro par de folhas verdadeiras estivesse totalmente expandido, aproximadamente 40 dias após o plantio. Neste momento, inoculou-se as duas folhas expandidas das plântulas com 5 ácaros, previamente mantidos em folhas sintomáticas de alfeneiro, infectadas pelo PfGSV, durante um período de 72 horas, para aquisição do vírus. Após a inoculação as plantas foram mantidas em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) e realizou-se coleta de duas folhas aleatórias a cada sete dias, durante um período de aproximadamente dois meses. Imediatamente após as coletas, as folhas foram fotografadas com câmera digital e armazenadas em freezer -80 °C, para posterior extração do RNA total da folha inteira, seguida de RT-PCR com primers específicos para detecção viral. O experimento foi realizado em duplicata, com oito plântulas por repetição.

Além disso, inoculou-se também duas plântulas por repetição, que foram observadas até o final do experimento, ou até o surgimento de sintomas, quando então se coletou as folhas inoculadas e procedeu-se como descrito anteriormente.

3.2.5 Ensaios de RT-PCR

Para detecção de PfGSV por RT-PCR nas folhas ainda verdes de maracujá realizou-se a extração de RNA total das folhas inteiras, com TRIzol, conforme recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, realizou-se um protocolo de purificação do RNA extraído para evitar possíveis contaminações com resíduos fenólicos ou proteicos. Para isso, completou-se o volume das amostras para 100 µL com RNAse-Free Water, adicionou-se 30 µL de etanol 100% e 10 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2. Essa mistura foi mantida em freezer -20 °C overnight. Posteriormente, centrifugou-se as amostras a 13.000 rpm por 30 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol 70%. Prosseguiu-se com nova centrifugação utilizando-se a mesma velocidade durante 15 minutos. Esta etapa foi realizada duas vezes, e logo após, descartou-se o sobrenadante e as amostras foram secas a temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este tempo, o pellet formado foi ressuspendido em 20 µL de RNAse-Free Water e armazenado em freezer -80 °C para os posteriores testes de RT-PCR.

Já para detecção de PfGSV por RT-PCR nas lesões presentes nas folhas das plantas-teste foi realizada a extração de RNA total com “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tal, o material de interesse foi macerado em nitrogênio líquido, no caso de folhas. Após a maceração, adicionou-se 400 µL de tampão CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e as amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada (4 °C), a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. Na sequência, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste, adicionou-se uma mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após a homogeneização das amostras, o próximo passo foi a incubação das mesmas a 56 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se às amostras 250 µL de etanol absoluto, realizou-se a homogeneização através da agitação em vortex, com posterior incubação das amostras em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram transferidas para as colunas do kit utilizado, que foram submetidas a centrifugação (7.000 rpm por 1 minuto). Logo após, o material filtrado nas colunas foi descartado, adicionou-se 500 µL de wash buffer e realizou-se a centrifugação a 7.000 rpm por 1 minuto. Esta última etapa foi realizada duas vezes e posteriormente, as colunas, sem adição de nenhum reagente, foram centrifugadas à velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. Após isto, adicionou-se 30 µL de RNAse

free water às colunas para eluição do RNA extraído. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 minuto, quando então foram centrifugadas a 13.000 rpm também por 1 minuto. Ao final desta etapa obteve-se o RNA total das amostras, que foi armazenado em freezer -80 °C.

No caso da extração de RNA total dos ácaros utilizados nos experimentos procedeu-se com a maceração dos mesmos em 100 µL de tampão CTAB. Após a maceração, adicionou-se mais 100 µL do tampão e a mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após isto, os próximos passos seguem conforme descrito anteriormente para a extração de folhas, realizando a eluição do RNA total com 30 µL de RNAse free water quando da extração de apenas um ácaro, e com 40 µL para a extração de um pool de ácaros.

Após a extração, 3 µL de cada amostra extraída foram utilizados para síntese de cDNA usando primers hexâmeros aleatórios e o kit “GoScript™ Reverse Transcriptase”, conforme recomendação do fabricante (Promega).

Para realização da PCR foram utilizados 5 µL de “GoTaq® Master Mixes” (Promega), 2,6 µL de Nuclease Free Water, 2 µL do cDNA obtido e 0,2 µL de cada primer utilizado, totalizando volume de 10 µL. Utilizou-se par de primers específico para detecção de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV: RNA2 F: 5’-CGATATTTGATCAATCCGTT-3’ e R: 5’-CACCTTAAAATTCGAGGGTT-3’ (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). A amplificação do fragmento ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 35 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 5 minutos. Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

3.2.6 Detecção de PfGSV nos tecidos das lesões necróticas em *Dolichos lablab*

A fim de complementar a detecção de PfGSV nas lesões necróticas presentes nas folhas de *D. lablab* após infecção experimental de PfGSV por ácaros virulíferos, pequenos fragmentos das nervuras com necrose, foram processados conforme descrito por Kitajima e Nome (1999): os tecidos foram fixados em mescla de glutaraldeído/paraformaldeído, pós-fixados com OsO_4, desidratados em gradiente acetona (30, 50, 70, 90 e 100%; 15 minutos em cada), infiltrados e emblocados em resina epóxica de Spurr. Os blocos foram seccionados em um ultramicrótomo (Leica EM UC6) equipado com navalha de diamante Diatome; as secções foram montadas

em retículos de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL JEM 1011, e as imagens registradas digitalmente.

3.2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e posteriormente agrupados pelo teste de Tukey ($p<0,05$), através do aplicativo SASM-Agri, desenvolvido por Canteri et al. (2001).

3.3 Resultados e Discussão

Após a triagem feita com as diferentes espécies de leguminosas e cultivares de feijoeiro para determinar uma planta indicadora eficiente para testes futuros com PfGSV, apenas *Vicia faba* e *Vigna radiata* demonstraram não ser hospedeiras deste vírus, não sendo possível a identificação de PfGSV na análise de RT-PCR (Figura 2), o que indica que as lesões locais necróticas observadas nestas folhas seriam apenas danos de alimentação do ácaro (Figura 1–B e E).

A porcentagem de transmissão de PfGSV para as outras espécies variou de 37,78% (*Mucuna pruriens*) a 100% (*Dolichos lablab*) (Tabela 2). Com exceção de *Cajanus cajan*, que apresentou lesão local necrótica no limbo foliar, as demais espécies apresentaram, como sintoma da infecção viral, lesões locais necróticas nas nervuras (Figura 1).

Dentre as plantas avaliadas, *D. lablab* mostrou-se altamente suscetível e também apresentou sintoma de necrose nas nervuras cinco dias após a inoculação com ácaros virulíferos, o que foi o menor tempo dentre as espécies estudadas. As demais, quando apresentaram sintomas, o fizeram a partir de sete dias após a inoculação. Além disso, esta espécie é de fácil cultivo e possui rápido crescimento, podendo ser utilizada para os experimentos com aproximadamente 10 dias após o plantio. Aliado a estes fatores, observou-se que os ácaros se desenvolvem bem nesta hospedeira, colonizando-a em poucos dias.

Embora com dificuldade para obtenção de secções ultrafinas que permitissem a visualização de partículas virais e viroplasmas, pode-se detectar efeitos citopáticos característicos da infecção por cilevírus (KITAJIMA et al., 2003) nos tecidos

correspondentes às lesões necróticas ao longo das nervuras em *D. lablab*, confirmando a presença de PfGSV indicada por métodos moleculares (Figura 3).

A obtenção de uma planta indicadora para uso em experimentos é de grande valia neste patossistema, pois em seu hospedeiro principal, o maracujazeiro, é possível a observação de sintomas apenas 1-2 meses após a inoculação das plantas, o que dificulta os estudos. Este longo período para o surgimento de sintomas também é válido às plantas de alfeneiro. Além de facilitar futuros experimentos com PfGSV, o uso de uma planta indicadora eficiente pode auxiliar no manejo da pinta verde, pois permitirá que os ácaros encontrados durante o monitoramento do pomar sejam facilmente testados quanto a presença do vírus, resultando no controle dos mesmos apenas quando apresentarem-se virulíferos.

Até o momento, as únicas plantas indicadoras para estudos envolvendo VTBs eram *Phaseolus vulgaris* cv. UNA (GARITA et al., 2013) e *Arabidopsis thaliana* L. (ARENA et al., 2017). No entanto, *A. thaliana* é de difícil crescimento em condições naturais, requerendo câmaras climatizadas, dificultando seu uso em muitos experimentos. Já *P. vulgaris* cv. UNA é comumente utilizado como planta-teste para experimentos com CiLV-C, devido a facilidade de cultivo e rápido crescimento. Esta espécie também apresentou bons resultados para PfGSV (Tabela 2), não havendo diferença significativa entre ela e *D. lablab*, entretanto, optou-se por trabalhar com esta última devido aos fatores descritos anteriormente. Ademais, esta torna-se mais uma opção para estudos com VTBs.

Tabela 2: Porcentagem de folhas sintomáticas das plantas-teste utilizadas para determinação de planta indicadora da infecção por passion fruit green spot virus (PfGSV).

Plantas Testadas	**Folhas com sintoma da infecção por PfGSV (%)**
Phaseolus vulgaris L. cv. UNA	95,56[a]
Vicia faba L.	0[c]
Vigna unguiculata (L.) Walp.	93,33[a]
Dolichos lablab L.	100[a]
Vigna radiata (L.) R. Wilczek	0[c]
Mucuna pruriens (L.) DC	37,78[b]
Cajanus cajan (L.) Millsp.	57,78[b]
Phaseolus vulgaris var L. Jalo	91,11[a]

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey: $p<0,05$).

Figura 1: Lesões observadas nas folhas das plantas-teste, utilizadas para determinação de planta indicadora da infecção causada por PfGSV, após sete dias da inoculação com ácaros virulíferos. **A –** lesão local necrótica na nervura de *Phaseolus vulgaris* cv. UNA; **B –** lesões locais necróticas na nervura de *Vicia faba*; **C –** lesão local necrótica na nervura de *Vigna unguiculata*; **D –** lesão local necrótica na nervura de *Dolichos lablab*; **E -** lesão local necrótica na nervura de *Vigna radiata*; **F -** lesão local necrótica na nervura de *Mucuna pruriens*; **G -** lesão local necrótica no limbo foliar de *Cajanus cajan*; **H -** lesão local necrótica na nervura de *Phaseolus vulgaris* var. Jalo.

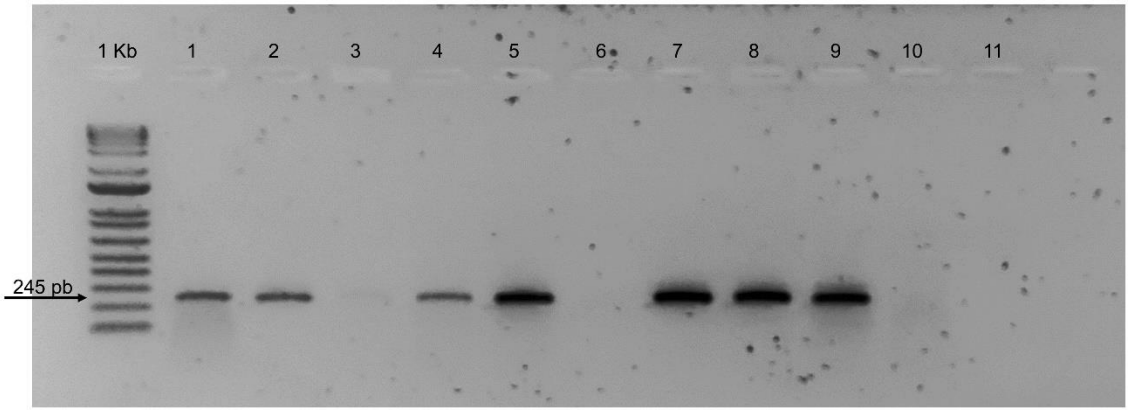


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em um pool de lesões retiradas de diferentes espécies de leguminosas após sete dias da inoculação com ácaros, *Brevipalpus yothersi*, virulíferos. Coluna 1: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9: lesões presentes, respectivamente, em folhas de *Phaseolus vulgaris* cv. UNA, *Vicia faba*, *Vigna unguiculata*, *Dolichos lablab*, *Vigna radiata*, *Mucuna pruriens*, *Cajanus cajan* e *Phaseolus vulgaris* var. Jalo. Coluna 10: controle dos reagentes da PCR; Coluna 11: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

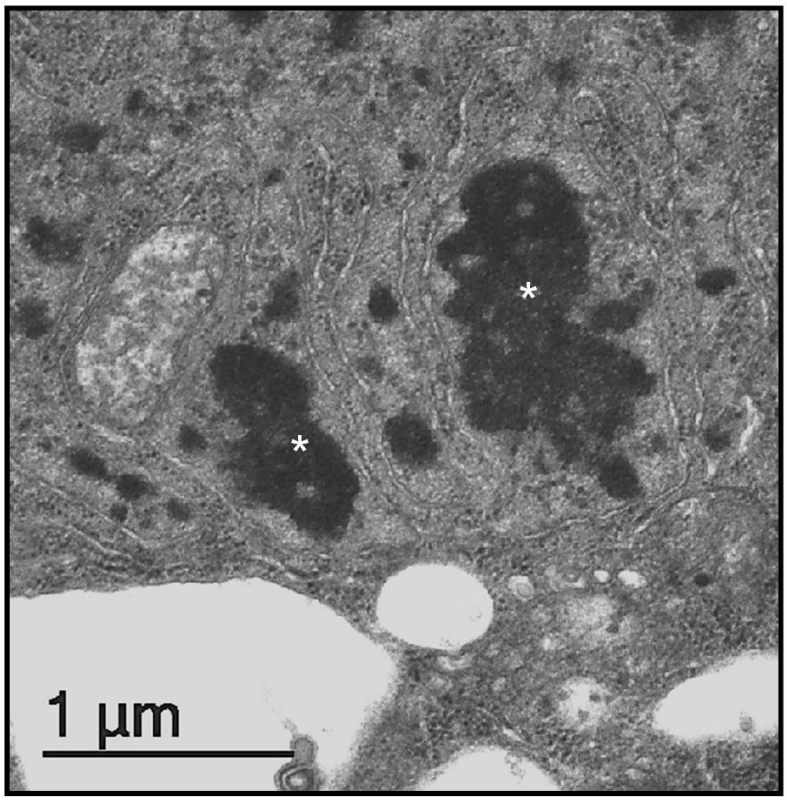


Figura 32: Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula epidermal de folha de *Dolichos lablab*, da região necrosada pela infecção pelo PfGSV. Nota-se a presença no citoplasma, de uma inclusão eléctron-densa e vacuolada, correspondente ao viroplasma, típica da infecção por cilevirus. *viroplasmas.

Quanto a detecção de PfGSV em folhas ainda verdes de maracujá, os sintomas foram visíveis apenas a partir da 5ª coleta, aos 35 dias após a inoculação das plantas (Figura 4). No entanto, foi possível a detecção do vírus desde a primeira coleta, aos sete dias após a inoculação (Figura 5), o que evidencia que apesar da ausência de sintomas o vírus está presente nas plantas, estando disponível para aquisição pelo ácaro-vetor, o que consequentemente, acarreta na disseminação da doença na área de plantio sem que se perceba.

Fica patente então que mesmo em plantas assintomáticas de maracujá, pode ocorrer infecção pelo PfGSV. Caso isto ocorra no viveiro, fica aberta a possibilidade de plantas infectadas serem levadas a campo e lá, na presença do ácaro-vetor, ocorrer a disseminação da virose. Isto sucedendo, com isolados agressivos do vírus, pode acarretar em perdas significativas, como as registradas quando de sua primeira detecção no estado de São Paulo (KITAJIMA et al., 1997) e na Bahia (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). Por outro lado, dada a extensa gama de hospedeiras de PfGSV (capítulo 2; SAITO, 2020), os maracujazeiros infectados

podem servir de fonte de inóculo para este vírus se disseminar a outras espécies de plantas, inclusive de valor econômico. Estes fatores tornam muito relevante o desenvolvimento de um ensaio de RT-qPCR para a detecção inicial de PfGSV, visando impedir a entrada de mudas doentes no local de cultivo, podendo também ser utilizado por programas de quarentena, a fim de evitar a introdução deste patógeno em novas áreas.

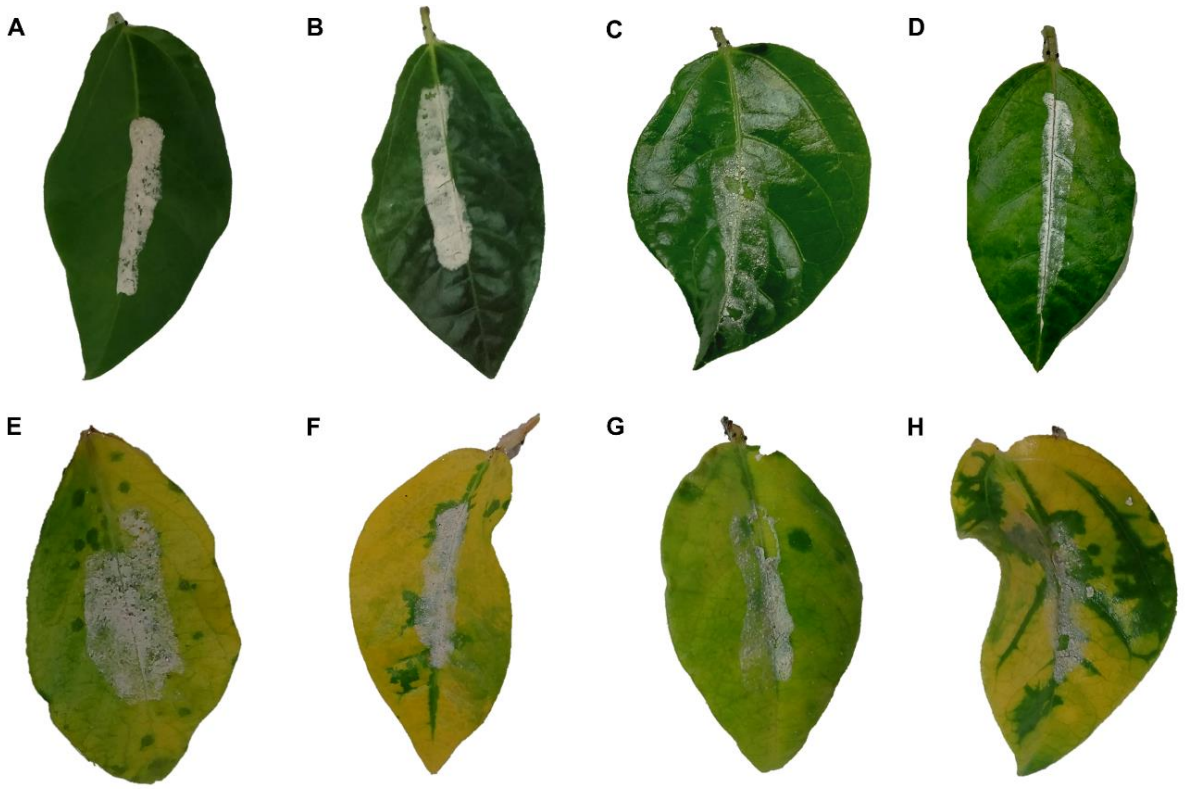


Figura 4: Folhas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) coletadas ao longo do tempo após inoculação com ácaros virulíferos. **A**, **B**, **C** e **D –** folhas verdes, assintomáticas, coletadas aos 7, 14, 21 e 24 dias após a inoculação, respectivamente; **E**, **F**, **G** e **H –** folhas senescentes, com sintoma da infecção de PfGSV (manchas/pintas verdes), coletadas aos 35, 42, 49 e 56 dias após a inoculação, respectivamente. Camada branca presente nas folhas refere-se a mistura de areia, gesso e trigo (1:1:1) utilizada para facilitar a colonização dos ácaros.

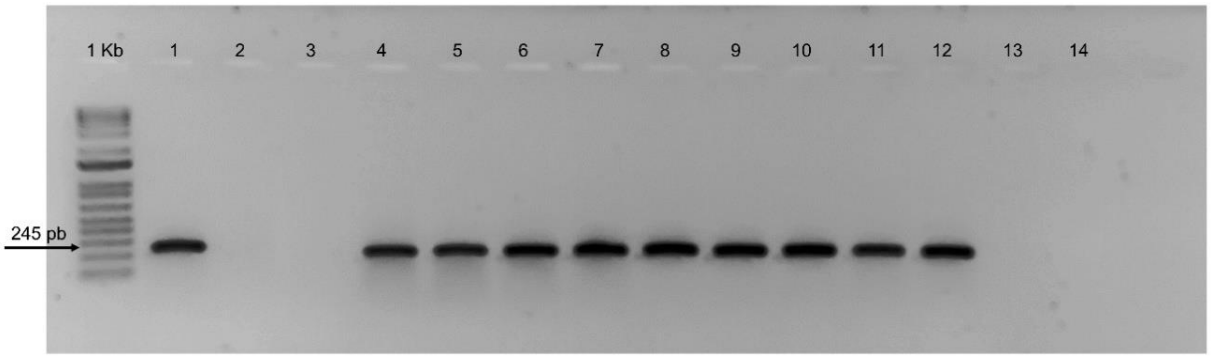


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em folhas verdes de maracujá-amarelo ao longo do tempo, após a inoculação com ácaros virulíferos. Coluna 1: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Coluna 2: controle negativo, folha assintomática de maracujá; Coluna 3: controle negativo, pool de ácaros avirulíferos; Colunas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11: folhas de maracujá coletadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias após a inoculação, respectivamente; Coluna 12: controle positivo, folhas sintomáticas de maracujá; Coluna 13: controle dos reagentes da PCR; Coluna 14: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4 Conclusão

Conclui-se que a espécie *D. lablab* é uma excelente indicadora da infecção ocasionada por PfGSV, e seu uso facilitará a realização de estudos que envolvam este vírus e seu vetor, *B. yothersi*, além de poder ser utilizada para otimizar os métodos de manejo da doença, permitindo a recomendação de controle apenas nos casos de ácaros virulíferos presentes no pomar.

Ademais, pode-se observar que mesmo sem a visualização de sintomas em folhas de maracujá-amarelo, é possível a detecção de PfGSV, após sete dias da inoculação com ácaros virulíferos, através de RT-PCR. Este dado permite o estabelecimento de um manejo eficiente da doença, pois a análise molecular de algumas plantas, mesmo assintomáticas, pode evitar a entrada de mudas doentes na área de cultivo.

Referências

ARENA, G.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; NUNES, M.A.; CHABI-JESUS, C.; CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. *Arabidopsis thaliana* as a model host for *Brevipalpus* mite-transmitted viroses. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 85-89, 2017.

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

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; CARBONELL, S.A.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Common bean: experimental indicator plant for Citrus leprosis virus C and some other cytoplasmic-type *Brevipalpus*-transmitted viroses. **Plant Disease**, v. 97, p.1346-1351, 2013.

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

KITAJIMA, E.; NOME, C. Microscopia electronica em virologia vegetal.In: Campo DM, Lenardon SL (eds) **Métodos para detectar patógenos sistêmicos.** Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria, Córdoba, p. 59–86, 1999.

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

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

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 16 p., 2020.

SAITO, M.S.G. **O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

4 EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO DE *Passion fruit green spot virus* POR DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Brevipalpus yothersi*

Resumo

Os vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTB) compartilham a característica de ocasionar em seus hospedeiros lesões localizadas, restritas ao local de alimentação do ácaro vetor, não infectando a planta sistemicamente. Embora os estudos sobre estes vírus tenham se intensificado nos últimos anos, principalmente em virtude do aumento da importância da leprose dos citros, a principal virose da citricultura brasileira atualmente, ocasionada pelo VTB citrus leprosis virus C – CiLV-C, ainda há muitas questões pendentes, principalmente quanto aos outros patossistemas dentro deste grupo de vírus. Uma destas questões, importantes para sua epidemiologia, é se há variações na eficiência de transmissão dos VTBs por diferentes populações do vetor. Com isso, neste trabalho, envolvendo outro cilevirus, o passion fruit green spot virus (PfGSV), procurou-se avaliar se existe diferença na sua taxa de transmissão por diferentes populações do vetor, *B. yothersi* Baker. Para isso, foram coletados ácaros do gênero *Brevipalpus* de diferentes locais e plantas hospedeiras, naturalmente infestadas. Os ácaros coletados foram utilizados para formação de colônias isolinhas (colônia formada a partir de uma única fêmea adulta), que quando estabelecidas foram identificadas por critérios morfológicos utilizando microscopia de luz e de varredura. Para os ensaios de transmissão do vírus utilizou-se como fonte de inóculo folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* Lour., onde os ácaros permaneceram por 72 horas para aquisição do vírus. Foram realizados ensaios utilizando-se um único ácaro e grupos de 15 ácaros. Os ensaios de transmissão foram realizados em folhas destacadas da planta teste, *Dolichos lablab* L., que após cinco dias da inoculação apresentavam lesões locais necróticas nas nervuras, como sintoma da infecção viral. A presença de PfGSV nas lesões observadas foi confirmada após a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos. Obteve-se 11 colônias isolinhas para estudo, sendo identificadas como espécimes de *B. yothersi*. Foi possível verificar que mesmo sendo da mesma espécie, as isolinhas desenvolveram-se de maneira distinta em condições experimentais, demonstrando variações em sua biologia, dependendo da planta e local onde foram encontradas. Houve diferenças significativas quanto à taxa de transmissão de PfGSV pelo vetor, entre as populações estudadas, tanto por um único ácaro como por grupos de 15 ácaros. Estes dados demonstram que diferentes populações de *B. yothersi*, variam quanto à capacidade de transmissão de PfGSV, como constatado anteriormente no patossistema CiLV-C/*B. yothersi*.

Palavras-chave: Pinta verde do maracujazeiro, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*.

Abstract

Viruses transmitted by mites of the genus *Brevipalpus* (BTV) share the characteristic of causing localized lesions in their hosts, restricted to the feeding site of the mite vector, not infecting the plant systemically. Although studies on these viruses have intensified in recent years, mainly due to the increasing importance of

citrus leprosis, the main viral disease in Brazilian citrus farming today, caused by the BTV citrus leprosis virus C – CiLV-C, there are still many outstanding issues, mainly regarding the other pathosystems within this group of viroses. One of these issues, important for its epidemiology, is whether there are variations in the transmission efficiency of BTV by different vector populations. Therefore, in this work, involving another cilevirus, the passion fruit green spot virus (PfGSV), we sought to assess whether there is a difference in its transmission rate by different populations of the vector, *B. yothersi* Baker. For this, mites of the genus *Brevipalpus* were collected from different locations and naturally infested host plants. The collected mites were used to form isoline colonies (colony formed from a single adult female), which when established were identified by morphological criteria using light and scanning microscopy. For the virus transmission assays, symptomatic leaves of *Ligustrum sinense* Lour. were used as inoculum source, where the mites remained for 72 hours to acquire the virus. Assays were performed using a single mite and groups of 15 mites. The transmission assays were carried out on detached leaves of the test plant, *Dolichos lablab* L., which after five days of inoculation showed local necrotic lesions on the veins, as a symptom of viral infection. The presence of PfGSV in the observed lesions was confirmed after extraction of total RNA followed by RT-PCR with specific primers. Eleven isolated colonies were obtained for study, being identified as specimens of *B. yothersi*. It was possible to verify that, even being of the same species, the isolines developed differently under experimental conditions, demonstrating variations in their biology, depending on the plant and place where they were found. There were significant differences regarding the transmission rate of PfGSV by the vector, between the populations studied, both by a single mite and by groups of 15 mites. These data demonstrate that different populations of *B. yothersi* vary in their ability to transmit PfGSV, as previously observed in the CiLV-C/*B. yothersi* pathosystem.

Keywords: Passion fruit green spot, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, *Brevipalpus*-Transmitted Viruses.

4.1 Introdução

O gênero *Brevipalpus* compreende cerca de 292 espécies descritas, sendo *B. phoenicis* Geijskes*, B. californicus* Banks, *B. obovatus* Donnadieu, *B. papayensis* Baker e *B. yothersi* Baker, as reconhecidas como vetores de fitoviroses (CASTRO et al., 2020, DE LILLO et al., 2021). Contudo, recentemente foram introduzidas alterações nos critérios de identificação deste grupo de ácaros, após uma revisão que passou a sugerir novos caracteres morfológicos para separação das espécies, o que foi corroborado por análises moleculares que já apontavam divergências e a presença de diversidade críptica (NAVIA et al., 2013; BEARD et al., 2015; ALVES et al., 2019). A reavaliação da espécie *B. phoenicis* revelou ser ela um complexo de

oito espécies, algumas erroneamente sinonimizadas e outras, novas para a literatura. Dentre elas *B. yothersi* seria a de maior importância agrícola devido por ser vetor de vários vírus, como CiLV-C (citrus leprosis virus C), CiLV-C2 (citrus leprosis virus C2), PfGSV (passion fruit green spot virus), ClCSV (clerodendrum chlorotic spot virus) e CiCSV (citrus chlorotic spot virus) (BEARD et al., 2015; ROY et al., 2015; RAMOS-GONZALEZ et al., 2016; 2017; 2018; TASSI et al., 2019; DE LILLO et al., 2021).

Avanços significativos têm sido obtidos nos últimos anos sobre os patossistemas envolvendo vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB), em especial a relação *B. yothersi* e CiLV-C, devido à importância da doença resultante desta interação para a citricultura brasileira – leprose dos citros (KITAJIMA; NOVELLI; ALBERTI, 2014; DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018; BASSANEZI, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre as relações vírus-vetor com os demais VTBs, como PfGSV.

Passion fruit green spot virus é um vírus pertencente ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*. É o agente causal da doença conhecida como pinta verde do maracujazeiro, devido às manchas verdes em frutos maduros, mas as plantas infectadas podem apresentar outros sintomas como lesões necróticas nos caules e manchas verdes nas folhas senescentes (KITAJIMA et al., 1997; 2003). Embora maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) seja o hospedeiro principal de PfGSV, alguns estudos tem demonstrado que este vírus apresenta uma ampla gama de hospedeiras naturais (capitulo 2; SAITO, 2020). Assim como os demais VTBs, este vírus não se movimentaria sistemicamente na planta, mantendo-se restrito ao ponto de alimentação do ácaro vetor.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi estudar se há diferença na eficiência de transmissão de PfGSV por diferentes populações de *B. yothersi*, buscando a obtenção de maiores informações sobre os patossistemas que envolvem VTBs, o que permitirá melhor compreensão por exemplo, da especificidade de transmissão dos mesmos, além de possibilitar o estabelecimento de medidas de controle mais eficientes.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta e formação das colônias isolinhas

Espécimes de *Brevipalpus* spp. foram coletados de diferentes plantas hospedeiras em diferentes localidades do território brasileiro. Após as coletas, realizadas com auxílio de lupa de bolso, os ácaros foram separados sob microscópio estereoscópico. Os ácaros foram então mantidos em condições de laboratório em folha destacada de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC), que vem se mostrando uma boa hospedeira para o estabelecimento de colônias de *Brevipalpus* spp., especialmente *B. yothersi*, em condições experimentais. Posteriormente, um único ácaro adulto foi transferido para uma folha primária destacada de feijão-de-porco para formação das colônias isolinhas.

A manutenção das colônias isolinhas em formação foi feita diariamente, verificando-se o desenvolvimento das mesmas em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) e a ausência de eventuais contaminações.

4.2.2 Identificação morfológica das colônias isolinhas

Após estabelecidas as colônias isolinhas, procedeu-se com a identificação morfológica das mesmas. Para tal, uma identificação preliminar das espécies coletadas foi feita em um microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, o qual permite analisar ácaros ainda vivos com aumentos da ordem de 1-2000x, o que possibilita a observação de alguns padrões dorsais, bem como o número de setas dorso-laterais.

Em sequência, para uma identificação definitiva, cinco indivíduos de cada isolinha foram coletados e fixados em etanol absoluto para posterior montagem em lâminas contendo meio de Hoyer. As lâminas obtidas foram examinadas em um fotomicroscópio Zeiss Axioimager D2, dotado de sistema DIC (contraste diferencial de interferência) e câmera digital, para identificação dos *Brevipalpus*, observando as características que definem as espécies como número e posição de setas no dorso, ventre, palpo e pernas, padrão de reticulação da cutícula e formato da vesícula da espermateca.

Além disso, visando obter maiores informações morfológicas sobre as isolinhas, como o padrão das microplacas, alguns indivíduos foram fixados em etanol 70%, desidratados em gradiente etanol (80, 90, 95 e 100%; 30 minutos em

cada), secos ao ponto crítico do CO_2 (Baltec CPD 030), montados em stubs de alumínio e aderidas com fita adesiva de cobre, cobertos com ouro em um “sputter coater” (Baltec SCD 050) e analisados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM IT300. As imagens obtidas foram registradas digitalmente.

Contou-se com o auxílio da Dra. Aline Daniele Tassi, especialista na área de taxonomia de *Brevipalpus* spp., durante todas as etapas de identificação, que foram realizadas conforme critérios estabelecidos por Beard et al. (2015) e pelo site Flat Mites of the World.

4.2.3 Fonte de inóculo

Para os ensaios de transmissão utilizou-se como fonte de inóculo do vírus, passion fruit green spot virus (PfGSV), folhas de alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) com sintomas típicos da infecção por este vírus (manchas ou anéis cloróticos), coletadas em parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba - SP. A presença de PfGSV na fonte de inóculo foi comprovada por ensaios prévios de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), usando iniciadores específicos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

Embora maracujá-amarelo seja o hospedeiro principal deste vírus, optou-se por utilizar o isolado de *L. sinense*, devido aos seguintes fatores: a infecção de alfeneiros pelo PfGSV é frequente, e assim pode-se sempre dispor de inóculo para os experimentos; os ácaros utilizados nos ensaios alimentaram-se bem nesta hospedeira; os sintomas da infecção por este vírus em maracujá só são visíveis quando a folha se encontra em processo de senescência, o que inviabiliza a alimentação dos ácaros nesta fonte de inóculo por mais de dois dias. Além disso, em ensaios prévios pode-se observar que os ácaros utilizados não se adaptam bem às folhas sintomáticas de maracujá; sabe-se que este isolado é o BSB1 (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) que apresenta alta similaridade (RNA1 > 99,1% e RNA2 > 97,3%) com o isolado Snp1 de PfGSV, tido como referência para a espécie.

4.2.4 Planta teste

Foram utilizadas folhas destacadas de *Dolichos lablab* L. como planta indicadora para os ensaios de transmissão com PfGSV, por esta espécie ter se mostrado, em experimentos preliminares (capítulo 3), 100% eficiente para esta finalidade, exibindo necrose das nervuras cinco dias após a inoculação.

As plantas foram produzidas em condições de casa de vegetação, até que o primeiro par de folhas estivesse totalmente expandido, o que ocorreu aproximadamente dez dias após o plantio, quando então as folhas foram destacadas e montadas em placas de Petri de 90 mm, sobre papel filtro umedecido e envoltas com algodão.

4.2.5 Eficiência de transmissão de PfGSV

As colônias isolinhas estabelecidas e identificadas foram utilizadas nos testes, para verificar se há diferença na eficiência de transmissão de PfGSV entre ácaros de diferentes localidades e retirados de diferentes plantas hospedeiras.

Visando determinar a eficiência de transmissão da colônia, ácaros de cada uma das isolinhas foram transferidos para folhas sintomáticas de alfeneiro, onde permaneceram durante 72 horas para aquisição do vírus. Logo após, grupos de 15 ácaros foram transferidos da fonte de inóculo para folhas destacadas de *D. lablab*, onde permaneceram por um período de cinco dias, quando então realizou-se a avaliação quanto ao surgimento ou não de lesões locais necróticas (LLN). A avaliação ocorreu através da observação das folhas em microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, para que fosse possível verificar a presença de lesões, mesmo que muito pequenas e iniciais. As imagens obtidas nesta etapa foram registradas digitalmente. Na sequência, coletou-se alguns dos ácaros das folhas sintomáticas e das possivelmente sadias, sob microscópio estereoscópico, para realizar a extração de RNA total e subsequente teste de RT-PCR. Todas as folhas foram fotografadas com câmera digital e àquelas que apresentaram sintomas da infecção viral tiveram os pedaços de tecido próximos às lesões removidos, armazenados em freezer -80 °C e posteriormente, submetidos a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos.

Os pedaços de tecido sintomático das folhas que apresentaram lesões foram então utilizados para realização do teste de RT-PCR, assim como os ácaros presentes nestas folhas, a fim de confirmar a presença de PfGSV. Também foi realizada a extração de RNA total dos ácaros onde não se observou a inoculação do vírus na planta teste, buscando se confirmar que os mesmos se alimentaram sobre tecido sintomático para PfGSV. O teste de RT-PCR foi realizado com um pool de lesões e ácaros, separadamente. O experimento foi realizado em triplicata, com 10 repetições por isolinha.

Além disso, verificou-se também a eficiência de transmissão individual dos ácaros de cada isolinha. Para isto, os ácaros foram mantidos em folhas sintomáticas de alfeneiro como descrito anteriormente. Após às 72 horas, um único ácaro possivelmente virulífero foi transferido para uma folha destacada da planta teste, onde também permaneceu por cinco dias. A avaliação ocorreu analisando-se a presença ou não de LLN e, posteriormente, realizou-se a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos, com um pool de lesões das folhas sintomáticas de cada repetição, bem como dos ácaros presentes nas mesmas. Assim como mencionado anteriormente, os ácaros das repetições onde não se observou o aparecimento de LLN pela alimentação do ácaro, isto é, folhas possivelmente sadias, foram coletados e avaliados quanto a presença de PfGSV, a fim de se avaliar se os mesmos haviam adquirido o vírus durante a alimentação na fonte de inóculo. O experimento foi realizado em duplicata, com 10 repetições por isolinha.

4.2.6 Ensaios de RT-PCR

Para detecção de PfGSV por RT-PCR nos ácaros e nas lesões presentes nas folhas foi realizada a extração de RNA total com “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tal, o material de interesse foi macerado em nitrogênio líquido, no caso de folhas. Após a maceração, adicionou-se 400 µL de tampão CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e as amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada (4 °C), a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. Na sequência, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste, adicionou-se uma mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após a homogeneização das amostras, o próximo passo foi a incubação das mesmas a 56 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se às amostras 250 µL de etanol absoluto, realizou-se a homogeneização através da agitação em vortex, com posterior incubação das amostras em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram transferidas para as colunas do kit utilizado, que foram submetidas a centrifugação (7.000 rpm por 1 minuto). Logo após, o material filtrado nas colunas foi descartado, adicionou-se 500 µL de wash buffer e realizou-se a centrifugação a 7.000 rpm por 1 minuto. Esta última etapa foi realizada duas vezes e posteriormente, as colunas, sem adição de nenhum reagente, foram centrifugadas à velocidade de 13.000 rpm

por 1 minuto. Após isto, adicionou-se 30 µL de RNAse free water às colunas para eluição do RNA extraído. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 minuto, quando então foram centrifugadas a 13.000 rpm também por 1 minuto. Ao final desta etapa obteve-se o RNA total das amostras, que foi armazenado em freezer -80 °C.

No caso da extração de RNA total dos ácaros utilizados nos experimentos procedeu-se com a maceração dos mesmos em 100 µL de tampão CTAB. Após a maceração, adicionou-se mais 100 µL do tampão e a mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após isto, os próximos passos seguem conforme descrito anteriormente para a extração de folhas, realizando a eluição do RNA total com 30 µL de RNAse free water quando da extração de apenas um ácaro, e com 40 µL para a extração de um pool de ácaros.

Após a extração, 3 µL de cada amostra extraída foram utilizados para síntese de cDNA usando primers hexâmeros aleatórios e o kit “GoScript™ Reverse Transcriptase”, conforme recomendação do fabricante (Promega).

Para realização da PCR foram utilizados 5 µL de “GoTaq® Master Mixes” (Promega), 2,6 µL de Nuclease Free Water, 2 µL do cDNA obtido e 0,2 µL de cada primer utilizado, totalizando volume de 10 µL. Utilizou-se par de primers específico para detecção de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV: RNA2 F: 5’-CGATATTTGATCAATCCGTT-3’ e R: 5’-CACCTTAAAATTCGAGGGTT-3’ (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). A amplificação do fragmento ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 35 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 5 minutos. Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

4.2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram analisados pelo modelo linear generalizado (GLM), e as análises foram realizadas utilizando o software R v.4.1.2.

4.3 Resultados e Discussão

Foram coletados ácaros de diferentes espécies hospedeiras e de oito locais distintos (Tabela 1). Totalizaram-se 14 colônias para formação das isolinhas. Em sua maioria, as colônias apresentavam mistura de espécies, como pode ser visto na tabela 1. Das 14 isolinhas obtidas, três não prosperaram bem em condições de laboratório, sendo descartadas, realizando-se os experimentos com as 11 isolinhas remanescentes.

Dentre as diferentes espécies presentes nas colônias, foi possível a formação de isolinhas somente de *B. yothersi*, pois esta espécie mostra-se mais adaptada às condições e hospedeira nas quais as colônias foram mantidas. A identificação dos ácaros das isolinhas como espécimes de *B. yothersi* (Figuras 1, 2, 3 e 4) se deu após a observação das características diagnósticas: ausência da seta *f2* no opistossoma (Figuras 2, 4–A e B); tarso II com 2 solenídios (Figura 4-G); palpo com 4 segmentos e seta do femorogenu septiforme e farpada (Figura 4-F); centro do propodossoma areolado; no opistossoma, região entre as setas *e1-e1* - *h1-h1* com bandas em forma de V; microplacas circulares a elípticas com sulcos paralelos (Figura 4-H); placa ventral verrucosa com células arredondadas; placa genital também verrucosa com células que se fundem (Figura 4–D e E); e a espermateca que apresenta um longo duto terminando em uma vesícula esclerotizada oval com um espinho distal (Figura 3) (BEARD et al., 2015). Salvo a isolinha 5, que apresentou microplacas lisas, com ausência de sulcos (Figura 5-A), os ácaros de todas as demais isolinhas revelaram as características esperadas para a espécie *B. yothersi*.

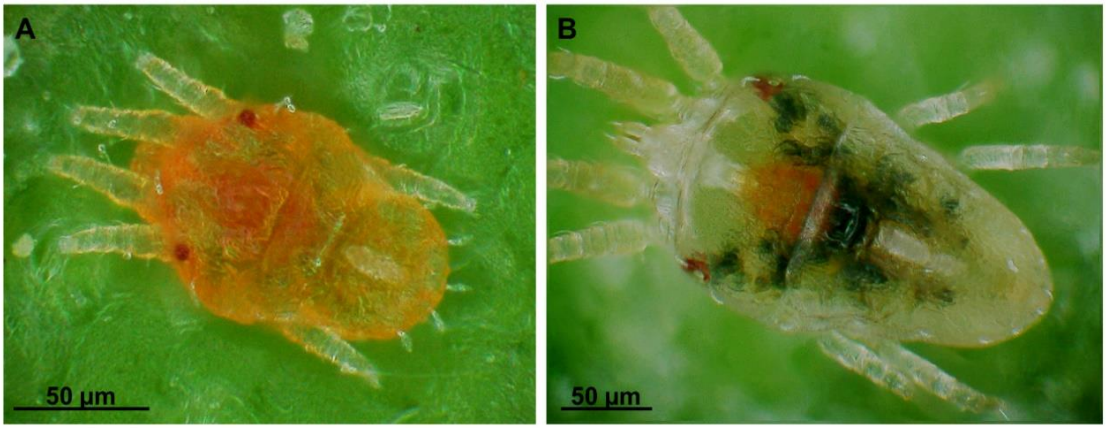


Figura 1: Imagem ao microscópio esteroscópico de alta resolução Hirox de uma larva (**A**) e uma fêmea adulta (**B**) de *Brevipalpus yothersi*.

Tabela 1: Locais de origem, plantas hospedeiras e espécies de ácaros do gênero *Brevipalpus* encontradas nas amostras utilizadas neste estudo.

Amostras*	Local de origem	Planta hospedeira	Espécies encontradas
1	Uruguaiana – RS	*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist	*B. yothersi* e uma nova espécie
2	Piracicaba – SP	*Mucuna* sp.	*B. californicus, B. papayensis* e *B. yothersi*
3	Campo Limpo Paulista – SP	*Lonicera japonica* Thunb.**	*B. californicus, B. papayensis* e *B. yothersi*
4	Santa Bárbara d'Oeste - SP	*Ligustrum lucidum* Ait. **	*B. californicus, B. obovatus* e *B. yothersi*
5	Piracicaba – SP	*Ligustrum sinense* Lour.**	*B. obovatus* e *B. yothersi*
6	Piracicaba – SP	*Ligustrum sinense***	*B. californicus, B. obovatus, B. papayensis* e *B. yothersi*
7	Piracicaba – SP	*Ligustrum sinense***	*B. californicus, B. obovatus, B. papayensis, B. salasi* Ochoa e *B. yothersi*
8	Jumirim – SP	*Citrus reticulata* L.**	*B. yothersi*
9	Piracicaba – SP	*Clerodendrum splendens* G. Don**	*B. yothersi*
10	Cruz das Almas – BA	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck**	*B. yothersi*
11	Piracicaba – SP	*Citrus sinensis***	*B. yothersi*
12	Santo Antônio da Platina - PR	*Buxus* sp.	*B. yothersi*
13	Santo Antônio da Platina - PR	*Clerodendrum thomsoniae* Balf.	*B. yothersi*
14	Brasília – DF	*Ligustrum sinense***	*B. californicus, B. ferraguti* Ochoa & Beard, *B. obovatus, B. papayensis, B. phoenicis* e *B. yothersi*

* As isolinhas foram denominadas conforme o número das amostras.
** Plantas com sintoma de infecção por VTB (vírus transmitidos por *Brevipalpus*).

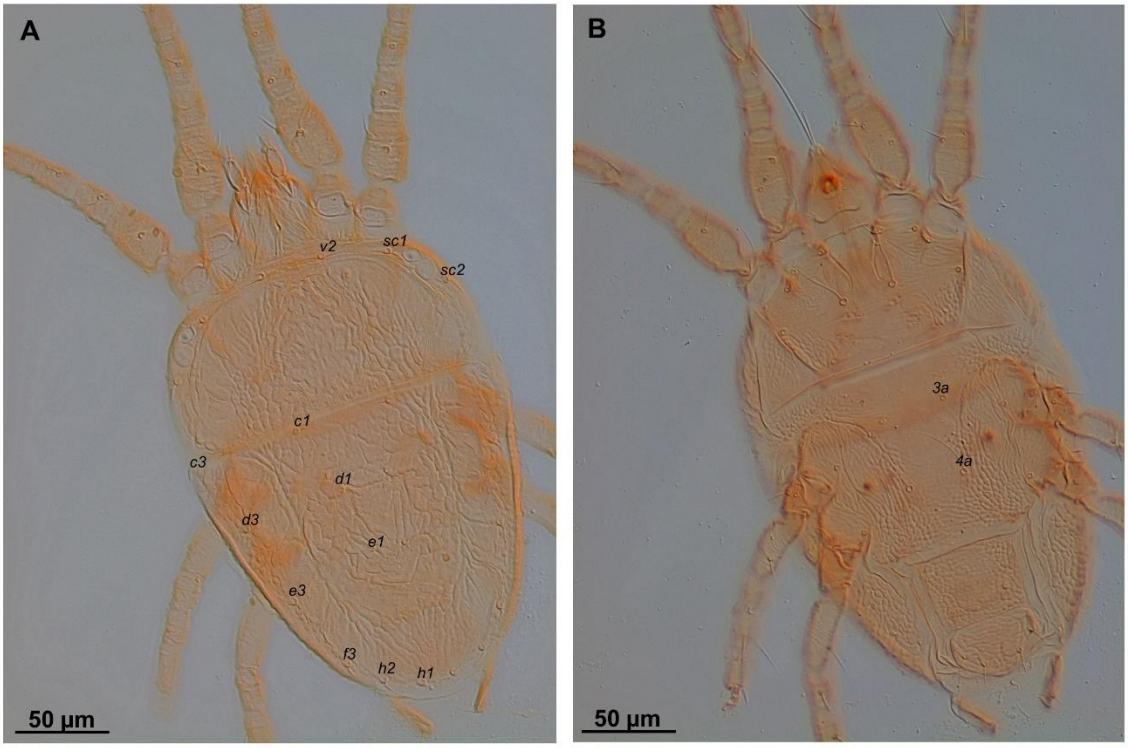


Figura 2: Imagens de microscopia de luz por contraste diferencial de interferência de um adulto de *Brevipalpus yothersi*. **A:** região dorsal. **B:** região ventral. Destaque para as setas utilizadas na identificação da espécie.

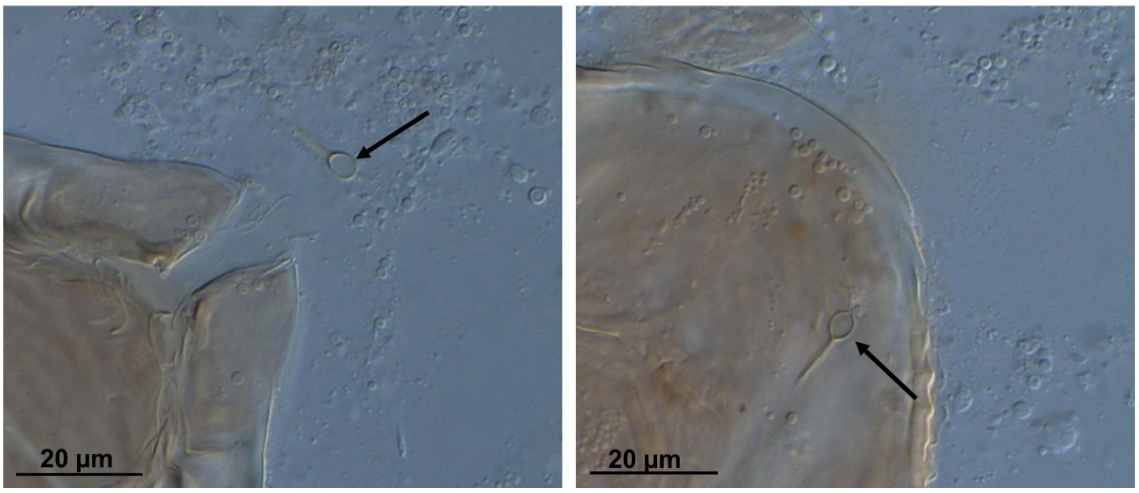


Figura 3: Imagens de microscopia de luz por contraste diferencial de interferência da espermateca de *Brevipalpus yothersi*.

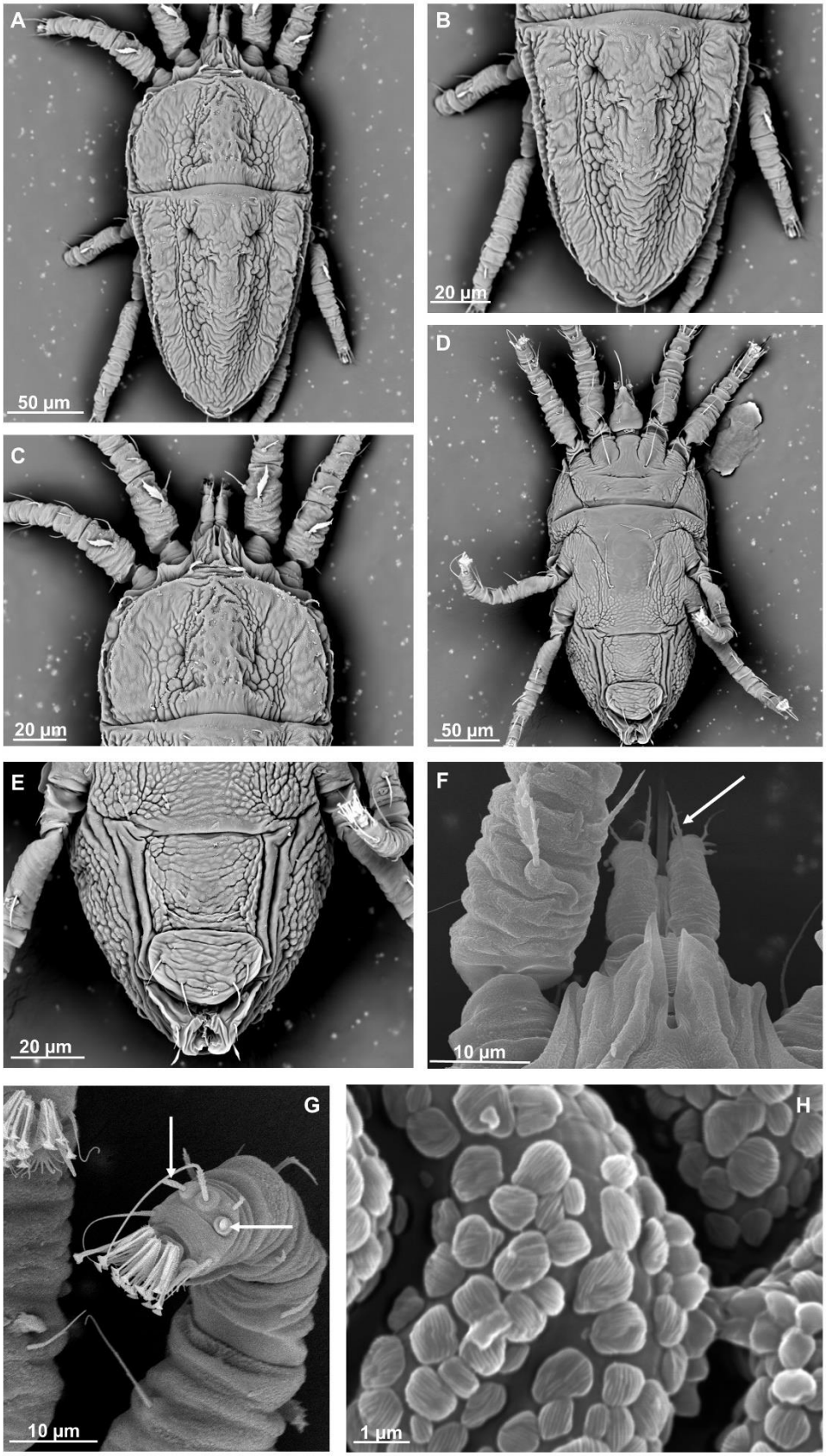


Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura de um adulto de *Brevipalpus yothersi*. **A:** região dorsal. **B:** detalhe do opistossoma. **C:** detalhe do propodossoma. **D:** região ventral. **E:** detalhe das placas ventral e genital. **F:** palpos com seta femorogenu. **G:** tarso II com dois solenídeos. **H:** microplacas dorsais.

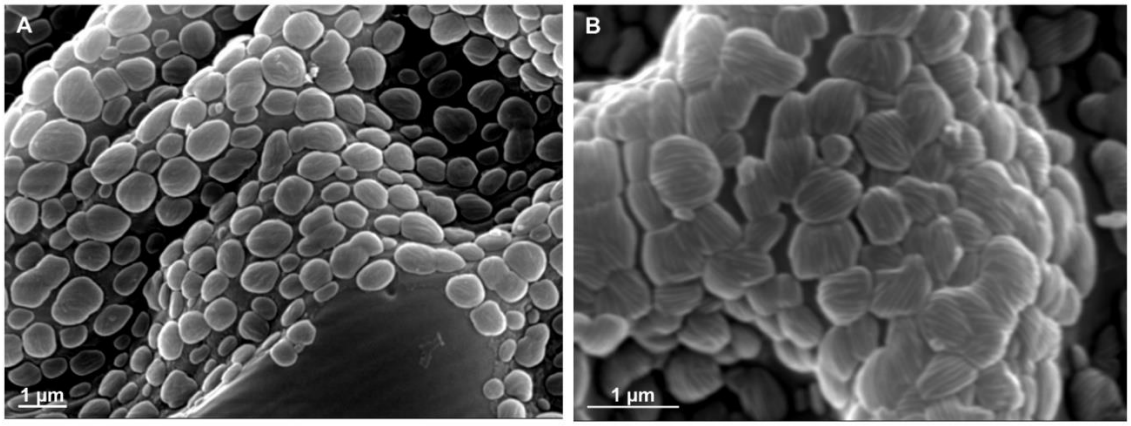


Figura 5: Micrografias eletrônicas de varredura das microplacas dorsais de *Brevipalpus yothersi*, onde pode-se observar a ausência de sulcos nos ácaros da isolinha 5 (**A**) e a presença de sulcos paralelos típicos da espécie (**B**).

Embora da mesma espécie, as isolinhas apresentaram comportamentos distintos quanto ao estabelecimento da colônia e em relação a transmissão de PfGSV. Isto pode ser explicado pelo fato de serem populações distintas, ou seja, foram retiradas de diferentes locais e plantas hospedeiras, portanto, estão adaptadas a diferentes condições.

Pode-se constatar variações significativas entre as isolinhas estudadas quanto à eficiência de transmissão de PfGSV, a qual foi avaliada baseada na porcentagem de folhas de *D. lablab* que se infectaram após infestação com ácaros que tiveram acesso às folhas de alfeneiro sintomáticas, infectadas pelo PfGSV. O aparecimento de lesões locais necróticas nas nervuras, a partir do 5º dia da infestação foi considerado como tendo ocorrido a infecção, que foi comprovada posteriormente por ensaios de RT-PCR. A análise dos dados obtidos indicou diferenças significativas ($p>0,05$) na eficiência de transmissão de PfGSV pelas diferentes populações analisadas. A porcentagem de transmissão de um grupo de 15 ácaros, variou de 30 a 100%, sendo que cinco populações se mostraram 100% eficientes para transmitir o vírus nesta situação (Tabela 2). Constatou-se que, mesmo nos casos em que a eficiência de transmissão foi menor (isolinhas 4, 5, 6, 8, 9, e 14), isto não se deu devido à falta de aquisição do vírus, já que os ensaios de RT-PCR nestes ácaros, indicaram a presença de PfGSV nos mesmos (Figura 6).

A eficiência de transmissão de PfGSV foi menor quando se utilizou apenas um ácaro, com um valor máximo de 65% e mínimo de 10% (Tabela 2). Pode-se detectar o vírus tanto nos ácaros retirados das folhas sintomáticas como naqueles

retirados das folhas assintomáticas, portanto, a aquisição do vírus ocorreu em todos os casos, com exceção das isolinhas 6 e 14. No caso da isolinha 6 a detecção viral ocorreu apenas nos ácaros que estavam presentes nas folhas sintomáticas, portanto, a baixa eficiência desta isolinha se explica também pela baixa aquisição do vírus. Já para a isolinha 14, não foi possível a detecção do fragmento do gene MP de PfGSV nem nos ácaros retirados das folhas sintomáticas como naqueles das folhas assintomáticas. Isto poderia decorrer de alguma falha durante o processo de extração do RNA total. Ou, alternativamente, o vetor pode ter inoculado toda carga viral adquirida nas folhas da planta teste, onde foi possível a detecção. Nesta situação a aquisição foi, supostamente, de uma quantidade viral suficiente apenas para que fosse possível a infecção das plantas (Figura 7).

Percebe-se pelos dados obtidos que há, em geral, correlação entre a eficiência de transmissão por um grupo de 15 ácaros e por apenas um ácaro, sendo que com exceção das isolinhas 9 e 14, a taxa de transmissão sempre é maior quando se avalia um grupo de ácaros. Não se pode, por outro lado, correlacionar esta eficiência com localidade ou espécie da planta. Os dados devem ser levados em conta com cautela, pois a isolinha representa clones de um único indivíduo dentro da população, o qual não necessariamente possa ser representativo da mesma.

Vários estudos tem demonstrado que *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) exibe rápida adaptação, apesar de alterações marcantes na biologia, incluindo mudanças na expressão gênica, quando submetidos a troca da hospedeira original (GOULD, 1979; FRY, 1989; AGRAWALL; VALA SABELIS, 2002; MAGALHÃES et al., 2007). A adaptação em espécies que exibem partenogênese, tende a ser mais frequente a plantas não hospedeiras originais do que o observado em espécies de ácaros sem essa característica reprodutiva (NAVAJAS et al., 2000; GRBIC et al., 2011; SCRANTON et al., 2013). Como *Brevipalpus* pertence a mesma superfamília que *T. urticae* e possui reprodução por partenogênese, esperava-se observar essa mesma característica de adaptação, no entanto, pode-se observar, pelo estabelecimento apenas de *B. yothersi* em feijão-de-porco, que essa plasticidade adaptativa só se apresenta para essa espécie testada, sendo possivelmente a mais polífaga dentro do gênero.

Como já observado anteriormente no sistema *Brevipalpus*-Cilevirus (TASSI et al., 2017; TASSI, 2018; TASSI et al., 2021) quando estudada a eficiência de

transmissão e a capacidade individual de diferentes populações de ácaros *Brevipalpus* na transmissão de VTBs, diferenças entre espécies e até mesmo populacionais são observadas. Além das prováveis variações genéticas decorrentes da pressão seletiva, isso pode ser explicado em partes, pelo estresse que os ácaros sofrem durante a montagem do experimento, além do fato de algum dos ácaros, por alguma razão, não se alimentarem das lesões enquanto permaneceram na fonte de inóculo, não adquirindo o vírus (TASSI et al., 2017; TASSI, 2018). Estas mesmas considerações podem ser aplicadas nesse trabalho para a transmissão de PfGSV.

Pode-se verificar que mesmo sendo da mesma espécie a taxa de transmissão varia de acordo com o ambiente e planta hospedeira de origem do vetor. Esperava-se que as isolinhas mais eficientes para transmissão de PfGSV fossem oriundas de plantas de alfeneiro, no entanto, as isolinhas com melhor desempenho foram retiradas de plantas de *Mucuna* sp. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck dos estados de São Paulo e Bahia, respectivamente. O local de origem e planta hospedeira, que podem estar ligados à uma diferente base genética e diferenças de expressão gênica, possivelmente, interferem na constituição ou desenvolvimento de algum receptor, ou via metabólica, que pode favorecer a transmissão viral (CATTO et al., 2022), como foi observado por Bello (2017), que verificou diferença na taxa de transmissão de alguns vírus pertencentes aos gêneros *Begomovirus*, *Carlavirus* e *Crinivirus* por duas populações da espécie críptica de *Bemisia tabaci* (Genn.) Mediterranean, pois a constituição de endossimbiontes, fator que interfere diretamente na transmissão de vírus para este vetor, nessas populações é distinta, pois são originárias de diferentes locais. Além disso, sabe-se que a planta hospedeira de origem, até mesmo cultivares diferentes, podem interferir no desenvolvimento e capacidade de sobrevivência da população do vetor (SCRANTON et al., 2013), portanto, pode-se ter um maior gasto energético para a adaptação a nova planta hospedeira, o que pode interferir na capacidade da população quanto a transmissão de vírus.

Estudos complementares, envolvendo análises moleculares, fazem-se necessários para verificar se estas populações são também haplótipos distintos, o que evidenciaria com maiores informações o motivo da diferença de transmissão entre as isolinhas, pois sabe-se que genótipos distintos do ácaro-do-enrolamento-do-trigo (*Aceria tosichella* Keifer - Acari: Eriophyidae) diferem na transmissão do *Tritimovirus*, wheat streak mosaic virus, sendo que apenas duas linhagens são

capazes de transmitir o vírus e mesmo dentro destas duas há diferença na taxa de transmissão (SINGH et al., 2018).

Tabela 2: Eficiência de transmissão de passion fruit green spot virus por diferentes isolinhas de *Brevipalpus yothersi*.

ISOLINHAS	ORIGEM	HOSPEDEIRA	EFICIÊNCIA DE TRANSMISSÃO (%)	
			15 ácaros	1 ácaro
1	Uruguaiana – RS	*Conyza bonariensis*	100[ac]	60[ae]
2	Piracicaba – SP	*Mucuna* sp.	100[ac]	65[ad]
4	Santa Bárbara d'Oeste - SP	*Ligustrum lucidum*	90[a]	65[ae]
5	Piracicaba – SP	*Ligustrum sinense*	90[a]	10[e]
6	Piracicaba – SP	*Ligustrum sinense*	67[ac]	40[bde]
8	Jumirim – SP	*Citrus reticulata*	77[ab]	35[cde]
9	Piracicaba – SP	*Clerodendrum splendens*	40[bc]	45[ae]
10	Cruz das Almas – BA	*Citrus sinensis*	100[ac]	65[ab]
11	Piracicaba – SP	*Citrus sinensis*	100[ac]	35[abc]
13	Santo Antônio da Platina - PR	*Clerodendrum thomsoniae*	100[ac]	55[a]
14	Brasília – DF	*Ligustrum sinense*	30[c]	45[de]

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (GLM seguido de teste de Tukey: $p<0,05$).

Vale destacar, que a isolinha 10 utilizada neste estudo mostrou-se muito eficiente para transmissão de PfGSV e vem demonstrando alta eficiência também para transmissão das duas estirpes (SJP e CRD) de CiLV-C (TASSI et al., 2021), o que evidencia o grande potencial desta população para transmitir vírus pertencentes ao gênero *Cilevirus*. O genoma desta isolinha encontra-se sequenciado (NAVIA et al., 2019), o que facilitará estudos futuros buscando compreender, por exemplo, a razão de sua alta eficiência para transmissão destes vírus.

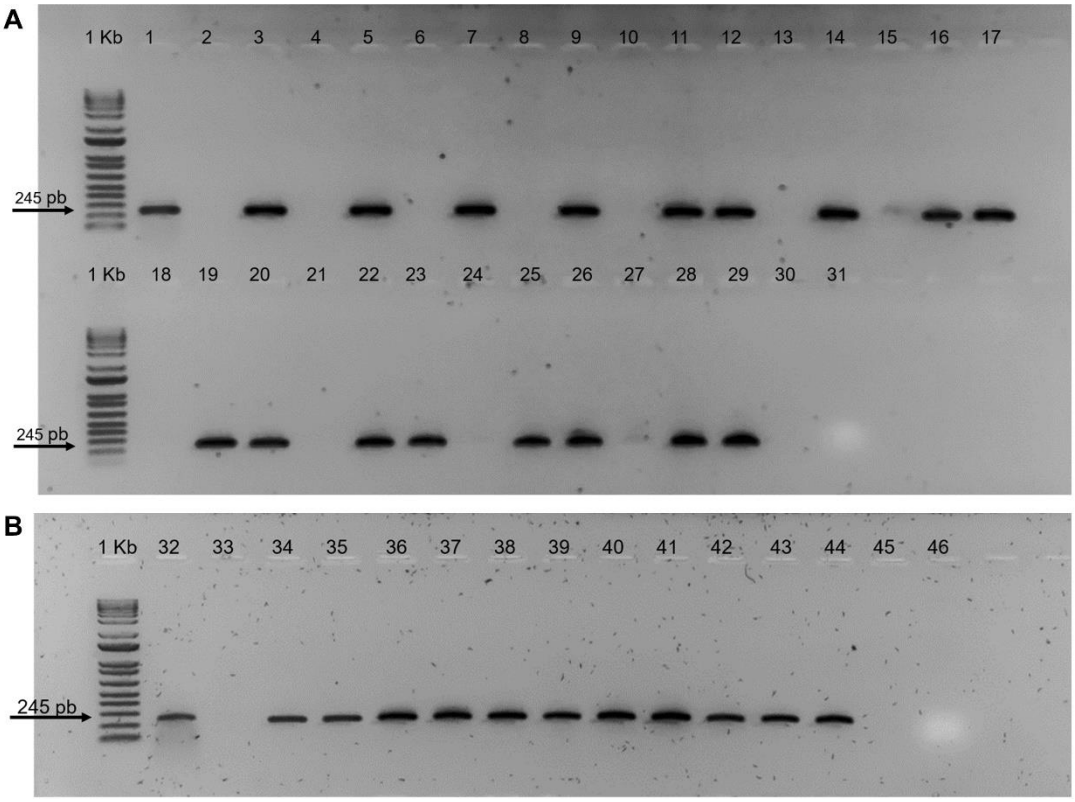


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). **A:** detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em um pool de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, de diferentes populações utilizadas neste estudo para avaliar a eficiência de transmissão de PfGSV por um grupo de 15 ácaros. **B:** detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em um pool de lesões presentes nas folhas de *Dolichos lablab* utilizadas nos experimentos. Colunas 1 e 32: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Colunas 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 18, 21, 24 e 27: controle negativo: ácaros avirulíferos de cada uma das isolinhas utilizadas; Colunas 3, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 19, 22, 25 e 28: ácaros das isolinhas 1, 10, 11, 2, 9, 13, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste; Colunas 12, 17, 20, 23, 26 e 29: ácaros das isolinhas 9, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente, retirados de folhas assintomáticas da planta teste; Colunas 30 e 45: controle dos reagentes da PCR; Colunas 31 e 46: água utilizada na PCR; Coluna 33: planta saudável de *D. lablab*; Colunas 34 a 44: folhas de *D. lablab* infectadas por PfGSV após inoculação com ácaros virulíferos das isolinhas 1, 10, 11, 2, 9, 13, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

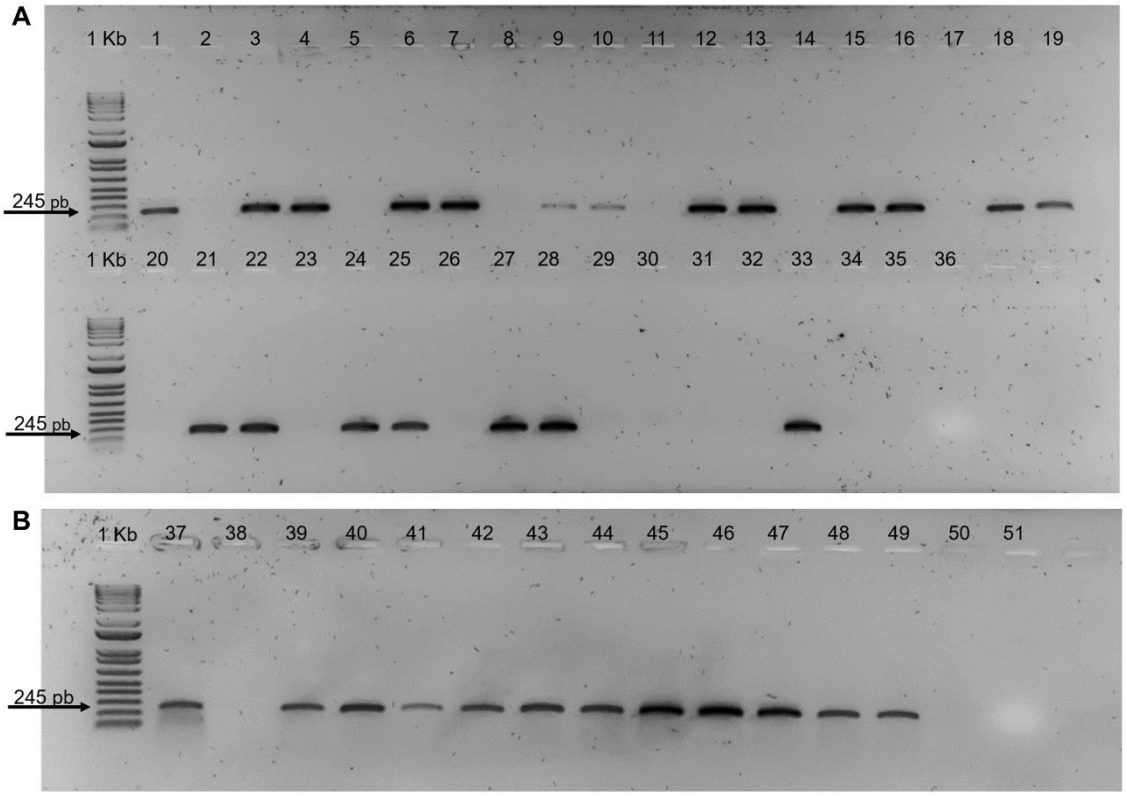


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). **A:** detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em pool de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, de diferentes populações para avaliação da eficiência de transmissão de PfGSV por um único ácaro. **B:** detecção específica do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em lesões presentes nas folhas de *Dolichos lablab* utilizadas neste estudo. Colunas 1 e 37: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Colunas 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32: controle negativo: ácaros avirulíferos de cada uma das isolinhas utilizadas; Colunas 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33: ácaros das isolinhas 1, 10, 11, 2, 9, 13, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste; Colunas 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 e 34: ácaros das isolinhas 1, 10, 11, 2, 9, 13, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente, retirados de folhas assintomáticas da planta teste; Colunas 35 e 50: controle dos reagentes da PCR; Colunas 36 e 51: água utilizada na PCR; Coluna 38: planta saudável de *D. lablab*; Colunas 39 a 49: folhas de *D. lablab* infectadas por PfGSV após inoculação com ácaros virulíferos das isolinhas 1, 10, 11, 2, 9, 13, 4, 5, 8, 14 e 6, respectivamente; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.4 Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam que diferentes populações de *B. yothersi* comportam-se de maneira distinta quando atuam como vetor do cilevirus PfGSV, havendo diferença significativa na taxa de transmissão do vírus pelas populações estudadas.

Referências

AGRAWAL, A.A.; VALA, F.; SABELIS, M.W. Induction of preference and performance after acclimation to novel hosts in a phytophagous spider mite: Adaptive plasticity? **The American Naturalist**, v. 159, p.553–565, 2002.

ALVES, J.L.S.; FERRAGUT, F.; MENDONÇA, R.S.; TASSI, A.D.; NAVIA, D. A new species of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) from the Azores Islands, with remarks on the *B. cuneatus* species group. **Systematic and Applied Acarology**, v. 24, p. 2184-2208, 2019.

BASSANEZI, R.B. **Manual de leprose dos citros: medidas essenciais de controle**. 3. ed. Araraquara: Fundecitrus, 23 p., 2019.

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

BELLO, V.H. **Transmissão de vírus pelas espécies crípticas de *Bemisia tabaci* Mediterranean e Middle East-Asia Minor 1**. 2017. 53 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

CASTRO, E.B.; MESA, N.C.; FERES, R.J.F.; MORAES, G.J.; OCHOA, R.; BEARD, J.J.; DEMITE, P.R. A newly available database of an important family of phytophagous mites: Tenuipalpidae Database. **Zootaxa**, v. 4868, p. 577-583, 2020.

CATTO, M.A.; MUGERWA, H.; MYERS, B.K.; PANDEY, S.; DUTTA, B.; SRINIVASAN, R. A Review on transcriptional responses of interactions between insect vectors and plant viruses. **Cells**, v. 11, 26 p., 2022.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

DIETZGEN, R.G.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; GOODIN, M.M.; KONDO, H. TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Dichorhaviruses in their host plants and mite vectors. **Advances in Virus Research**, v. 102, p. 119-148, 2018.

FREITAS-ASTÚA, J.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; ARENA, G.D.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Oppinion in Virology**, v. 33, p. 66-73, 2018.

FRY, J.D. Evolutionary adaptation to host plants in a laboratory population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae* Koch. **Oecologia**, v. 81, p.559–565, 1989.

GOULD, F. Rapid host range evolution in a population of the phytophagous mite *Tetranychus urtica*e Koch. **Evolution**, v. 33, p.791–802, 1979.

GRBIĆ, M.; VAN LEEUWEN, T.; CLARK, R.M.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P. et al. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. **Nature**, v. 479, p.487–492, 2011.

KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Acrinotrichida) Part 1. An update on the biology and economical importance of *Brevipalpus* mites. **Zoologica**, v. 160, p. 1-10, 2014.

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

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

MAGALHÃES, S.; FAYARD, J.; JANSSEN, A.; CARBONELL, D.; OLIVIERI, I. Adaptation in a spider mite population after long-term evolution on a single host plant. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, p. 2016–2027, 2007.

NAVAJAS, M.; TSAGKARAKOV, A.; LAGNEL, J.; PERROT-MINNOT, M.J. Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari:Tetranychidae): Polymorphism, host races or sibling species? **Experimental and Applied Acarology**, v. 24, p. 365–376, 2000.

NAVIA, D.; MENDONÇA, R.S.; FERRAGUT, F.; MIRANDA, L.C.; TRINCADO, R.C.; MICHAUX, J.; NAVAJAS, M. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologica Scripta**, v. 42, p. 406-426, 2013.

NAVIA, D.; NOVELLI, V.M.; ROMBAUTS, S.; FREITAS-ASTÚA, J.; MENDONÇA, R.S.; NUNES, M.A; MACHADO, M.A.; LIN, Y.C.; LE, P.; ZHANG, Z.; GRBIC, M.; WYBOUW N.; JOHANNES, A.J.; LEEUWEN, T.V.; PEER, Y.V. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, e01563-18, 2019.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; BANGUELA-CASTILLO, A.; TASSI, A.D.; RODRIGUES, M.C.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; FREITAS-ASTÚA, J. Unveiling the complete genome sequence of *Clerodendrum chlorotic spot virus*, a putative *Dichorhavirus* infecting ornamental plants. **Arch.Virology**, v. 163, p. 2519-2524, 2018.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BEWRON, M.; ARENA, G; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus* C. **Viruses**, v. 8, p. 153, 2016.

RAMOS-GONZALEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C., GUERRA-PERAZA, O.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus* N: a new *Dichorhavirus* causing citrus leprosis disease. **Phytopathology**, v. 107, p. 963-976, 2017.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 16 p., 2020.

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

SAITO, M.S.G. **O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

SINGH, K.; WEGULO, S.N.; SKORACKA, A.; KUNDU, J.K. Wheat streak mosaic virus: a century old virus with risingimportance worldwide. **Molecular Plant Pathology**, v.19, p. 2193-2206, 2018.

SCRANTON, K.; STAVRINIDES, M.; MILLS, N.J.; VALPINE, P. Small-scale intraspecific life history variation in herbivorous spider mites (*Tetranychus pacificus*) is associated with host plant cultivar. **PLoS ONE**, v. 8, e72980, 2013.

TASSI, A.D. **Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus**. 2018. 263 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2018.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREISTAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v.71, p. 227-241, 2017.

TASSI, A.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Diferencial transmission of citrus leprosis virus C strains by *Brevipalpus yothersi* subpopulations. **Anais 52 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, p.169, 2021.

TASSI, A.D.; SAITO, M.S.G.; NUNES, M.A.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Reavaliação das espécies do ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus*, vetores de vírus de plantas. **Anais 51 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Recife. p. 775, 2019.

5 POSSIBILIDADE DE CO-TRANSMISSÃO DE *Passion fruit green spot virus* E *Citrus leprosis virus C*

Resumo

Os vírus representam o segundo maior grupo de microrganismos causadores de doenças em plantas. As doenças causadas por vírus são de difícil controle e grande importância para algumas culturas. Um grupo em particular de fitovírus tem despertado grande interesse nos últimos anos, devido ao aumento de sua incidência e prejuízos ocasionados. Este grupo é conhecido como VTB (Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*), cujo representante de maior importância econômica é o citrus leprosis virus C (CiLV-C), agente causal da leprose dos citros. Outro VTB recentemente caracterizado é o passion fruit green spot virus (PfGSV), responsável pela pinta verde do maracujazeiro. CiLV-C e PfGSV são vírus pertencentes ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, sendo transmitidos por ácaros da espécie *Brevipalpus yothersi* Baker, e apresentam como sintoma característico em seus hospedeiros o desenvolvimento de lesões localizadas, não infectando a planta sistemicamente. Embora venham despertando interesse, muitos questionamentos ainda são feitos sobre os VTBs, como por exemplo, sua origem, evolução e epidemiologia. Como parte dos esforços para esclarecer tais tópicos, avaliou-se a possibilidade de co-transmissão de CiLV-C e PfGSV por *B. yothersi*, visando avaliar o risco de uma possível recombinação. Para isso, um grande grupo de ácaros, de duas isolinhas diferentes, foi posto a se alimentar sucessivamente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e em folhas sintomáticas de afineiro (*Ligustrum sinense* Lour.) (e vice-versa), durante 48 horas em cada uma das fontes de inóculo. Após isto, os ácaros foram transferidos para folhas da planta indicadora, *Dolichos lablab* L., onde permaneceram por cinco dias. A presença dos vírus nas folhas da planta-teste foi avaliada através da extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos. Não houve co-transmissão dos cilevirus avaliados, pelas isolinhas utilizadas. Uma das isolinhas apresentou-se capaz de adquirir ambos os vírus, desde que alimentada primeiro na fonte de inóculo de CiLV-C. Os dados aqui obtidos sugerem que a internalização destes cilevirus por *B. yothersi* pode envolver receptores presentes no epitélio intestinal que reconheceriam os vírus, e no caso, PfGSV parece ser reconhecido por todos os receptores, saturando-os caso seja ingerido primeiro, impedindo a internalização de CiLV-C quando este é ingerido na sequência.

Palavras-chave: Leprose dos citros, Pinta verde do maracujazeiro, Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*, *Cilevirus*, Recombinação.

Abstract

Viruses represent the second largest group of microorganisms that cause disease in plants. Diseases caused by viruses are difficult to control and of great importance for some cultures. A particular group of phytoviruses has aroused great interest in recent years, due to the increase in their incidence and losses caused. This group is known as BTV (*Brevipalpus*-Transmitted Viruses), whose representative of greatest economic importance is citrus leprosis virus C (CiLV-C), the causal agent of citrus leprosis. Another recently characterized BTV is the passion

fruit green spot virus (PfGSV), responsible for the passion fruit green spot. CiLV-C and PfGSV are viruses belonging to the genus *Cilevirus*, *Kitaviridae* family, being transmitted by mites of the species *Brevipalpus yothersi* Baker, and presenting as a characteristic symptom in their hosts the development of localized lesions, not infecting the plant systemically. Although they have aroused interest, many questions are still asked about BTV, such as their origin, evolution and epidemiology. As part of efforts to clarify these topics, the possibility of co-transmission of CiLV-C and PfGSV by *B. yothersi* was evaluated, aiming to assess the risk of a possible recombination. For this, a large group of mites, from two different isolines, were fed successively on symptomatic orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and symptomatic leaves of privet (*Ligustrum sinense* Lour.) (and contrariwise), for 48 hours in each of the inoculum sources. After that, the mites were transferred to leaves of the indicator plant, *Dolichos lablab* L., where they remained for five days. The presence of the virus in the leaves of the test plant was evaluated through the extraction of total RNA followed by RT-PCR with specific primers. There was no co-transmission of the viruses used by the isolines. One of the isolines was able to acquire both viruses, provided that it was first fed into the CiLV-C inoculum source. The data obtained here suggest that the internalization of these cileviruses by *B. yothersi* may involve receptors present in the intestinal epithelium that would recognize the viruses, and in this case, PfGSV seems to be recognized by all receptors, saturating them if it is ingested first, preventing the internalization of CiLV-C when it is ingested in sequence.

Keywords: Citrus leprosis, Passion fruit green spot, *Brevipalpus*-Transmitted Viruses, *Cilevirus*, Recombination.

5.1 Introdução

Os vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB) são conhecidos desde o início do século XX, e os estudos sobre os mesmos intensificaram-se nos últimos anos (KITAJIMA; NOVELLI; ALBERTI, 2014; DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018), principalmente em decorrência da importância da leprose dos citros para o setor citrícola, sendo esta a principal virose da citricultura brasileira atualmente (BASTIANEL et al., 2010; BASSANEZI, 2019). Esta doença é causada pelo VTB, citrus leprosis virus C (CiLV-C), pertencente ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, sendo a espécie-tipo deste gênero (LOCALI-FABRIS et al., 2006; QUITO-AVILA et al., 2020). Este vírus apresenta duas estirpes, conhecidas como CRD (Cordeirópolis) e SJP (São José do Rio Preto) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

Um outro VTB, recentemente caracterizado e incluído no mesmo gênero, é o passion fruit green spot virus (PfGSV), agente causal da pinta verde do maracujazeiro, que no passado foi responsável por grandes perdas em alguns

pomares no estado de São Paulo quando foi relatado pela primeira vez (KITAJIMA et al., 1997; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

CiLV-C e PfGSV apresentam genoma constituído de RNA de fita simples, senso positivo e bissegmentado (PASCON et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). Ambos são transmitidos por ácaros da espécie *B. yothersi* Baker (DE LILLO et al., 2021) e têm como característica em comum, o desenvolvimento de lesões restritas aos locais de alimentação do ácaro-vetor, tanto nas folhas como nos frutos e ramos infectados, não movimentando-se sistemicamente na planta.

Sabendo-se que PfGSV e CiLV-C são dois cilevirus, transmitidos pela mesma espécie de *Brevipalpus*, procurou-se no presente trabalho avaliar a possibilidade de co-transmissão destes dois vírus pelo ácaro vetor, buscando informações sobre o risco de uma possível recombinação entre os mesmos.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Colônias de *Brevipalpus yothersi*

Utilizou-se no presente trabalho duas isolinhas de ácaros, previamente identificadas como espécimes de *B. yothersi* de acordo com Beard et al. (2015). Estas isolinhas foram escolhidas por demonstrarem o melhor desenvolvimento em condições de laboratório e a melhor eficiência de transmissão para o vírus passion fruit green spot virus (ver capítulo 4). As isolinhas serão aqui chamadas de isolinhas 2 e 10.

Os ácaros foram mantidos em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) em folhas destacadas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC).

5.2.2 Fontes de inóculo

Utilizou-se como fonte de inóculo do vírus PfGSV folhas de alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) com sintomas típicos da infecção por este vírus (manchas ou anéis cloróticos), coletadas em parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba – SP. Optou-se por utilizar o isolado de *L. sinense*, devido a infecção de alfeneiros pelo PfGSV ser frequente, e assim pode-se sempre dispor de inóculo para os experimentos; os ácaros utilizados nos ensaios alimentaram-se bem nesta hospedeira; os sintomas da infecção por este vírus em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. – hospedeiro principal do vírus) só são visíveis quando

a folha se encontra em processo de senescência, o que inviabiliza a alimentação dos ácaros nesta fonte de inóculo por mais de dois dias. Além disso, em ensaios prévios pode-se observar que os ácaros utilizados não se adaptam bem às folhas sintomáticas de maracujá; sabe-se, em virtude de sequenciamentos realizados anteriormente, que este se trata do isolado BSB1 (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) que apresenta alta similaridade (RNA1 > 99,1% e RNA2 > 97,3%) com o isolado Snp1 de PfGSV, tido como referência para a espécie.

Para CiLV-C utilizou-se frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra) com sintomas típicos da infecção viral (lesão local necrótica deprimida, de cor marrom, circundada por um halo amarelado quando em frutos ainda verdes) (BASSANEZI, 2019), procedentes de pomares de laranjeiras da região de Reginópolis – SP, onde a leprose dos citros é recorrente.

A presença dos vírus nas fontes de inóculo foi comprovada por ensaios prévios de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), usando iniciadores específicos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; CHABI-JESUS et al., dados não publicados).

5.2.3 Planta teste

Utilizou-se folhas destacadas de *Dolichos lablab* L. como planta indicadora para os ensaios de transmissão, pois esta é uma planta que demonstrou alta eficiência para indicação da infecção por PfGSV (ver capítulo 3), apresentando necrose das nervuras cinco dias após a inoculação. Além disto, em ensaios preliminares pode-se verificar que é também uma boa planta teste para indicar a infecção de CiLV-C. Aliado a estes fatores, *D. lablab* também apresenta rápido crescimento, possibilitando que com cerca de dez dias após o plantio já se tenha folhas (primeiro par de folhas) com desenvolvimento ideal para montagem dos experimentos.

As plantas foram produzidas em condições de casa de vegetação e as folhas utilizadas foram destacadas e montadas em placas de Petri de 90 mm, sobre papel filtro umedecido e envoltas com algodão.

5.2.4 Co-transmissão de PfGSV e CiLV-C

A possibilidade de uma co-transmissão de CiLV-C e PfGSV foi investigada, fazendo ácaros das duas isolinhas mais eficientes para transmissão de PfGSV, se

alimentarem sucessivamente em frutos sintomáticos de *C. sinensis*, para aquisição de CiLV-C e logo após, em folhas sintomáticas de *L. sinense* para aquisição de PfGSV, e vice-versa. Os ácaros foram mantidos em cada uma das fontes de inóculo por 48 horas.

Após a aquisição de ambos os vírus, os ácaros foram transferidos, em grupos de cinco ácaros, para folhas destacadas da planta teste, onde permaneceram por um período de cinco dias, quando realizou-se a avaliação quanto ao surgimento ou não de lesões locais necróticas (LLN). A avaliação ocorreu através da observação das folhas em microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, para que fosse possível verificar a presença de lesões, mesmo que muito pequenas e iniciais. As imagens obtidas nesta etapa foram registradas digitalmente. Na sequência, coletou-se alguns dos ácaros das folhas sintomáticas e das possivelmente sadias, sob microscópio estereoscópico, para realizar a extração de RNA total e subsequente teste de RT-PCR. Todas as folhas foram fotografadas com câmera digital e àquelas que apresentaram sintomas da infecção viral tiveram os pedaços de tecido próximos às lesões removidos, armazenados em freezer -80 °C e posteriormente, submetidos a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos.

Os pedaços de tecido sintomático das folhas que apresentaram lesões foram então utilizados para realização do teste de RT-PCR, assim como os ácaros presentes nestas folhas, a fim de confirmar a presença de PfGSV. Também foi realizada a extração de RNA total dos ácaros onde não se observou a inoculação do vírus na planta teste, buscando confirmar que os mesmos se alimentaram sobre tecido sintomático para PfGSV. O teste de RT-PCR foi realizado com um pool de lesões e ácaros, separadamente. O experimento foi realizado em triplicata, com 10 folhas por repetição, para cada uma das isolinhas.

Além disso, realizou-se também a transferência de apenas um ácaro adulto para as folhas da planta indicadora, a fim de verificar se um mesmo ácaro é capaz de adquirir e transmitir mais de um cilevirus. Neste caso, após às 48h de alimentação em ambas as fontes de inóculo, um único ácaro adulto foi transferido para uma folha da planta teste, onde também permaneceu por cinco dias. A avaliação ocorreu analisando-se a presença ou não de LLN, e posteriormente, realizou-se a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos, com as lesões de cada uma das folhas sintomáticas, de cada repetição, bem como dos ácaros presentes nas mesmas. Assim como mencionado anteriormente, os

ácaros das folhas onde não se observou o aparecimento de LLN, isto é, folhas possivelmente sadias, foram coletados e avaliados quanto a presença de PfGSV, a fim de se avaliar se os mesmos haviam adquirido o vírus. Neste caso, o experimento também foi realizado em triplicata, com 10 folhas por repetição.

5.2.5 Eficiência de transmissão de CiLV-C pela isolinha 2

Dentre as isolinhas utilizadas neste experimento, sabe-se que ambas apresentam alta eficiência para transmissão de PfGSV (capítulo 4), no entanto, apenas a isolinha 10 é comprovadamente eficiente para transmissão de CiLV-C (TASSI et al., 2021). Com isso, realizou-se teste de transmissão de CiLV-C com a isolinha 2 para verificar sua eficiência para transmissão deste vírus.

Para tal, ácaros adultos da isolinha 2 foram transferidos para frutos sintomáticos de laranja, onde permaneceram 48 horas para aquisição do vírus. Logo após, grupos de 15 ácaros foram transferidos da fonte de inóculo para folhas destacadas de *D. lablab*, onde permaneceram por um período de cinco dias, quando então realizou-se a avaliação quanto ao surgimento ou não de lesões locais necróticas (LLN). A avaliação ocorreu através da observação das folhas em microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, para que fosse possível verificar a presença de lesões, mesmo que muito pequenas e iniciais. As imagens obtidas nesta etapa foram registradas digitalmente. Na sequência, coletou-se alguns dos ácaros das folhas sintomáticas e das possivelmente sadias, sob microscópio estereoscópico, para realizar a extração de RNA total e subsequente teste de RT-PCR. Todas as folhas foram fotografadas com câmera digital e àquelas que apresentaram sintomas da infecção viral tiveram os pedaços de tecido próximos às lesões removidos, armazenados em freezer -80 °C e posteriormente, submetidos a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos.

Os pedaços de tecido sintomático das folhas que apresentaram lesões foram então utilizados para realização do teste de RT-PCR, assim como os ácaros presentes nestas folhas, a fim de confirmar a presença de CiLV-C. Também foi realizada a extração de RNA total dos ácaros onde não se observou a inoculação do vírus na planta teste, buscando se confirmar que os mesmos se alimentaram sobre tecido sintomático para CiLV-C. O teste de RT-PCR foi realizado com um pool de lesões e ácaros, separadamente. O experimento foi realizado em duplicata, com 5 folhas por repetição.

Além disso, verificou-se também a eficiência de transmissão individual dos ácaros desta isolinha. Para isto, os ácaros foram mantidos em laranjas sintomáticas, como descrito anteriormente. Após às 48 horas, um único ácaro possivelmente virulífero foi transferido para uma folha destacada da planta teste, onde também permaneceu por cinco dias. A avaliação ocorreu analisando-se a presença ou não de LLN, e posteriormente, realizou-se a extração de RNA total seguida de RT-PCR com primers específicos, com as lesões de cada uma das folhas sintomáticas, de cada repetição, bem como dos ácaros presentes nas mesmas. Assim como mencionado anteriormente, os ácaros das repetições onde não se observou o aparecimento de LLN pela alimentação do ácaro, isto é, folhas possivelmente sadias, foram coletados e avaliados quanto a presença do vírus, a fim de se confirmar se houve aquisição viral. O experimento foi realizado em duplicata, com 10 folhas por repetição.

5.2.6 Ensaios de RT-PCR

Para detecção de PfGSV por RT-PCR nos ácaros e nas lesões presentes nas folhas foi realizada a extração de RNA total com “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tal, o material de interesse foi macerado em nitrogênio líquido, no caso de folhas. Após a maceração, adicionou-se 400 µL de tampão CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e as amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada (4 °C), a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. Na sequência, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste, adicionou-se uma mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após a homogeneização das amostras, o próximo passo foi a incubação das mesmas a 56 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se às amostras 250 µL de etanol absoluto, realizou-se a homogeneização através da agitação em vortex, com posterior incubação das amostras em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram transferidas para as colunas do kit utilizado, que foram submetidas a centrifugação (7.000 rpm por 1 minuto). Logo após, o material filtrado nas colunas foi descartado, adicionou-se 500 µL de wash buffer e realizou-se a centrifugação a 7.000 rpm por 1 minuto. Esta última etapa foi realizada duas vezes e posteriormente, as colunas, sem adição de nenhum reagente, foram centrifugadas à velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. Após isto, adicionou-se 30 µL de RNAse free water às colunas para

eluição do RNA extraído. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 minuto, quando então foram centrifugadas a 13.000 rpm também por 1 minuto. Ao final desta etapa obteve-se o RNA total das amostras, que foi armazenado em freezer -80 °C.

No caso da extração de RNA total dos ácaros utilizados nos experimentos procedeu-se com a maceração dos mesmos em 100 µL de tampão CTAB. Após a maceração, adicionou-se mais 100 µL do tampão e a mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após isto, os próximos passos seguem conforme descrito anteriormente para a extração de folhas, realizando a eluição do RNA total com 30 µL de RNAse free water quando da extração de apenas um ácaro, e com 40 µL para a extração de um pool de ácaros.

Após a extração, 3 µL de cada amostra extraída foram utilizados para síntese de cDNA usando primers hexâmeros aleatórios e o kit “GoScript™ Reverse Transcriptase”, conforme recomendação do fabricante (Promega).

Para realização da PCR foram utilizados 5 µL de “GoTaq® Master Mixes” (Promega), 2,6 µL de Nuclease Free Water, 2 µL do cDNA obtido e 0,2 µL de cada primer utilizado, totalizando volume de 10 µL. Utilizou-se par de primers específico para detecção de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV: RNA2 F: 5’-CGATATTTGATCAATCCGTT-3’ e R: 5’-CACCTTAAAATTCGAGGGTT-3’ (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). A amplificação do fragmento ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 35 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 5 minutos. Para CiLV-C utilizou-se primer degenerado para detecção de um fragmento da proteína p24: RNA2 F: 5’-CGCAGTTTCCTAATAACAAA-3’ e R: 5’-GGGAGTTCAGCATAAAGC-3’ (CHABI-JESUS et al., dados não publicados). As condições para amplificação deste fragmento foram: 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 40 segundos; e 72 °C por 5 minutos.

Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

5.3 Resultados e Discussão

Foi possível verificar que ácaros da isolinha 10 são capazes de adquirir os dois vírus analisados, CiLV-C e PfGSV, quando se alimentam primeiramente em frutos de laranja sintomáticos e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro, sendo possível detectar os dois vírus em um único ácaro (Figuras 1 e 7-A), bem como em um grupo de ácaros (Figuras 2 e 7-B). A detecção de ambos os vírus foi possível mesmo nos ácaros retirados das folhas assintomáticas (Figuras 1 e 2). Um único ácaro avaliado não adquiriu CiLV-C e um outro não adquiriu PfGSV (Figura 1), mas neste último caso, a transmissão para as folhas inoculadas ocorreu (Figura 3), o que indica que pode ter ocorrido alguma falha durante o processo de extração deste ácaro, ou ainda, houve a aquisição apenas de uma carga viral suficiente para realizar a inoculação.

No entanto, não se pode verificar a presença de CiLV-C nas folhas de *D. lablab* inoculadas com um único ácaro (Figura 3), o que indica que o vetor, embora tenha adquirido os vírus, não foi capaz de inocular os dois, sendo possível a detecção apenas de PfGSV. Entretanto, quando se avaliou a inoculação por um grupo de 5 ácaros pode-se perceber que há inoculação de ambos os vírus, porém a carga viral mais elevada é a de PfGSV, sendo possível a observação de bandas muito fracas para CiLV-C (Figura 3). Este resultado, no entanto, pode ser devido a atividade de um ou outro ácaro que, por alguma razão, adquiriu apenas CiLV-C.

Sabe-se que esta isolinha é comumente utilizada para testes de transmissão com CiLV-C, apresentando alta eficiência para esta finalidade (TASSI et al., 2021), porém, os dados aqui obtidos indicam que a mesma parece ser mais eficiente para transmitir PfGSV (capítulo 4), o que pode ocorrer em razão de uma maior concentração deste vírus em relação ao CiLV-C.

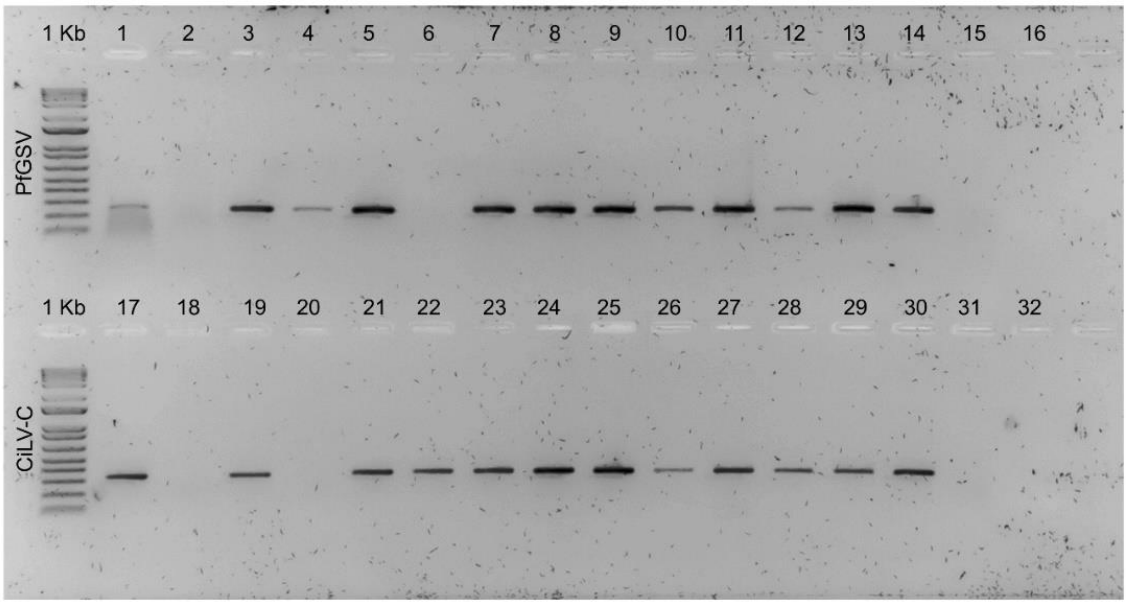


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um ácaro, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 10; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 6 e 22: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 7, 8, 9, 23, 24 e 25: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 10 e 26: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 11, 12, 13, 27, 28 e 29: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 14 e 30: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

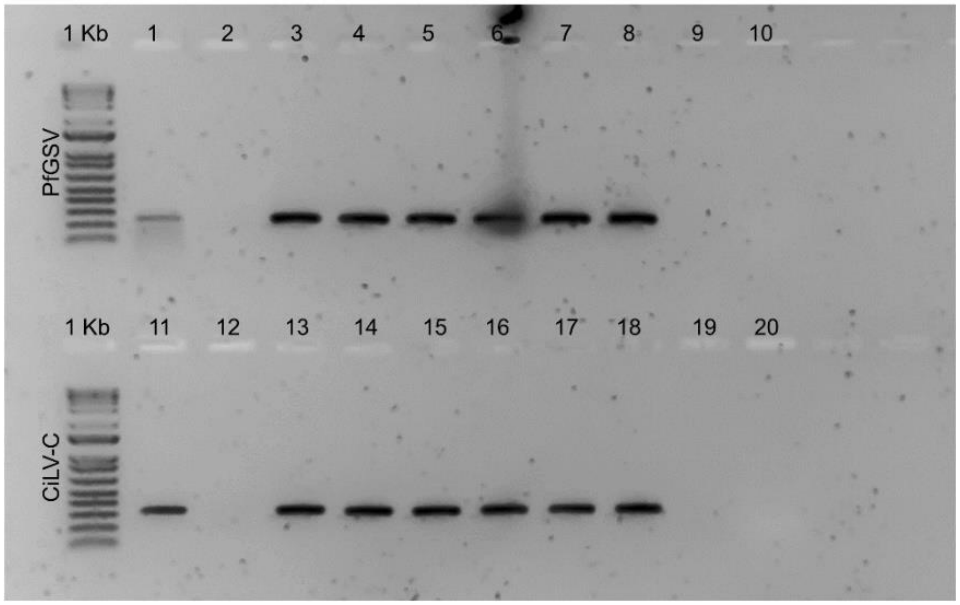


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um grupo de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 11: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 12: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 10; Colunas 3, 4, 5, 13, 14 e 15: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 6, 7, 8, 16, 17 e 18: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 9 e 19: controle dos reagentes da PCR; Colunas 10 e 20: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

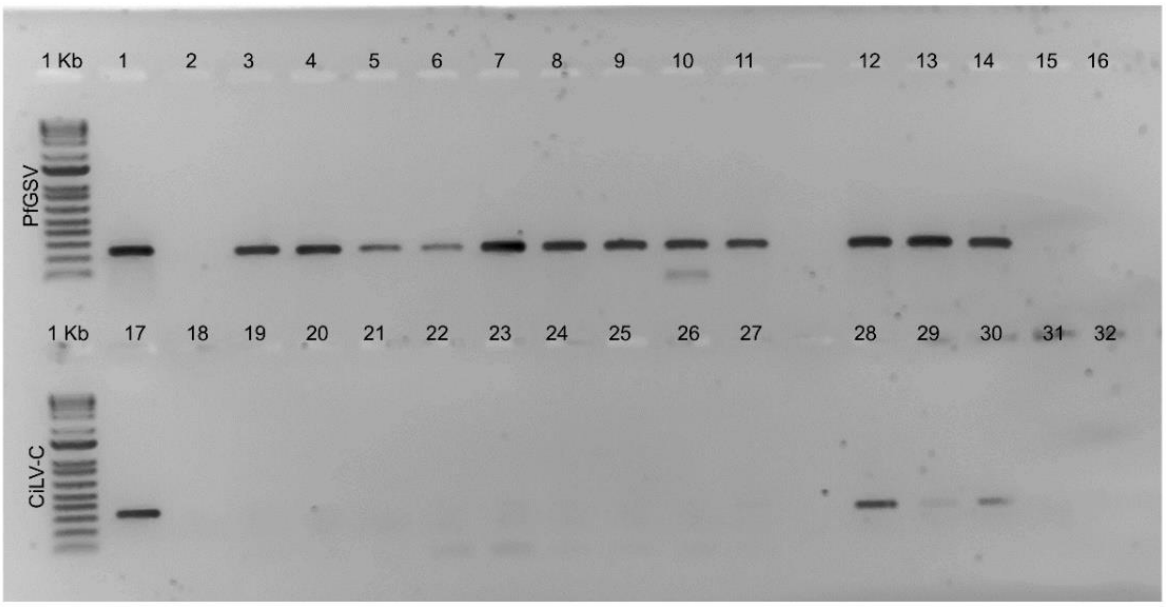


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em folhas de *Dolichos lablab*, inoculadas com ácaros virulíferos da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo – folha saudável de *D. lablab*; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: folhas sintomáticas da primeira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 6, 7, 8, 22, 23 e 24: folhas sintomáticas da segunda repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 9, 10, 11, 25, 26 e 27: folhas sintomáticas da terceira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 12, 13, 14, 28, 29 e 30: folhas sintomáticas da primeira, segunda e terceira repetições, inoculadas com um grupos de ácaros, extraídas em um pool de lesões; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Quando os ácaros da isolinha 10 foram postos a se alimentar primeiramente em folhas de alfeneiro, foi possível a detecção de PfGSV em todos os ácaros e folhas inoculadas (Figuras 4, 5, 6 e 7). Já a detecção de CiLV-C ocorreu apenas em duas folhas (Figura 6), o que indica que dois dos ácaros analisados foram capazes de adquirir e transmitir, mesmo que em baixa concentração, os dois vírus. A não detecção de CiLV-C nos ácaros que se alimentaram das respectivas folhas, pode ser explicada pela baixa carga viral restante no ácaro; o ácaro pode ter adquirido apenas o suficiente para inocular as folhas; ou ainda, por alguma falha durante a extração do RNA total.

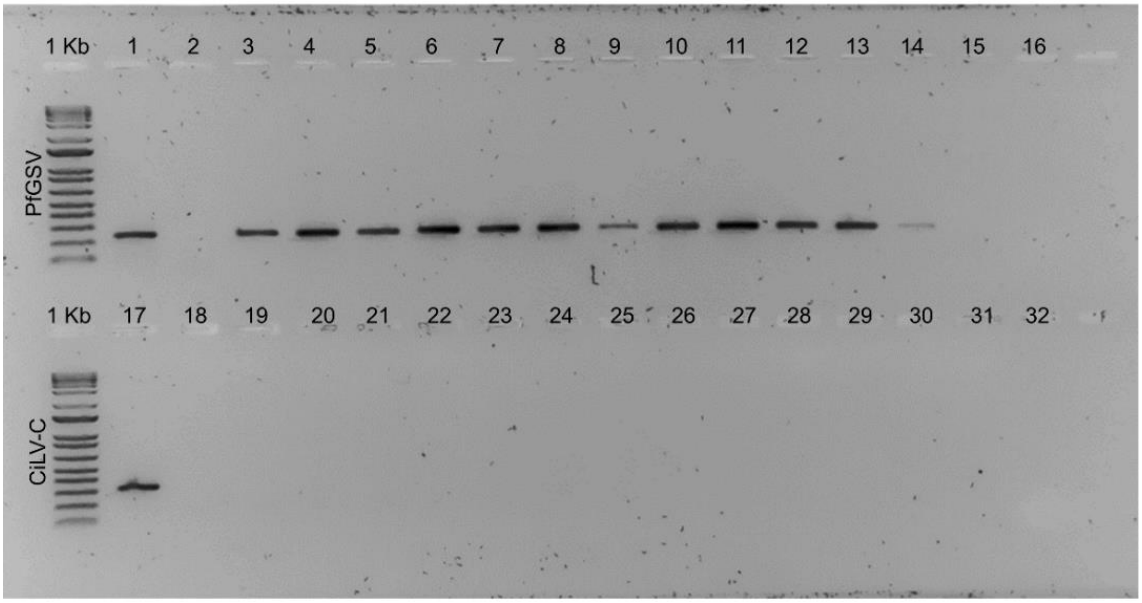


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um ácaro, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 10; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 6 e 22: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 7, 8, 9, 23, 24 e 25: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 10 e 26: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 11, 12, 13, 27, 28 e 29: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 14 e 30: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

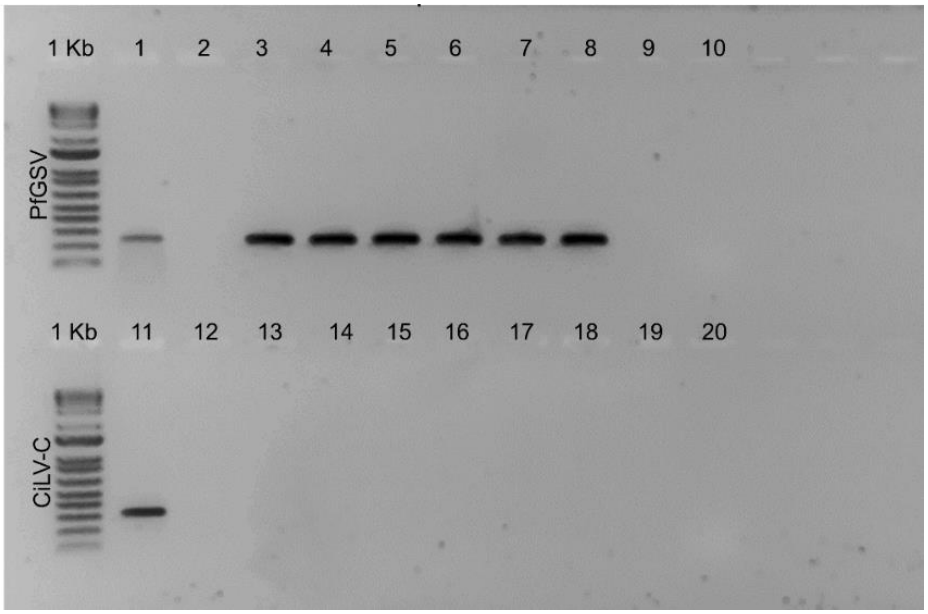


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um grupo de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 11: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 12: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 10; Colunas 3, 4, 5, 13, 14 e 15: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 6, 7, 8, 16, 17 e 18: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 9 e 19: controle dos reagentes da PCR; Colunas 10 e 20: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

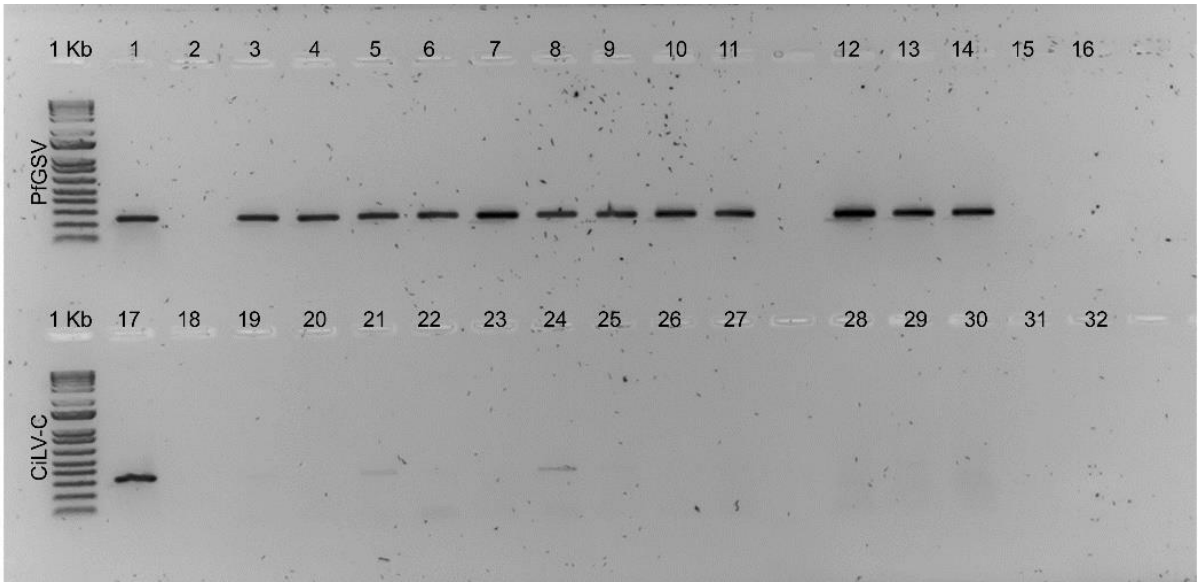


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em folhas de *Dolichos lablab*, inoculadas com ácaros virulíferos da isolinha 10 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo – folha saudável de *D. lablab*; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: folhas sintomáticas da primeira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 6, 7, 8, 22, 23 e 24: folhas sintomáticas da segunda repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 9, 10, 11, 25, 26 e 27: folhas sintomáticas da terceira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 12, 13, 14, 28, 29 e 30: folhas sintomáticas da primeira, segunda e terceira repetições, inoculadas com um grupos de ácaros, extraídas em um pool de lesões; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

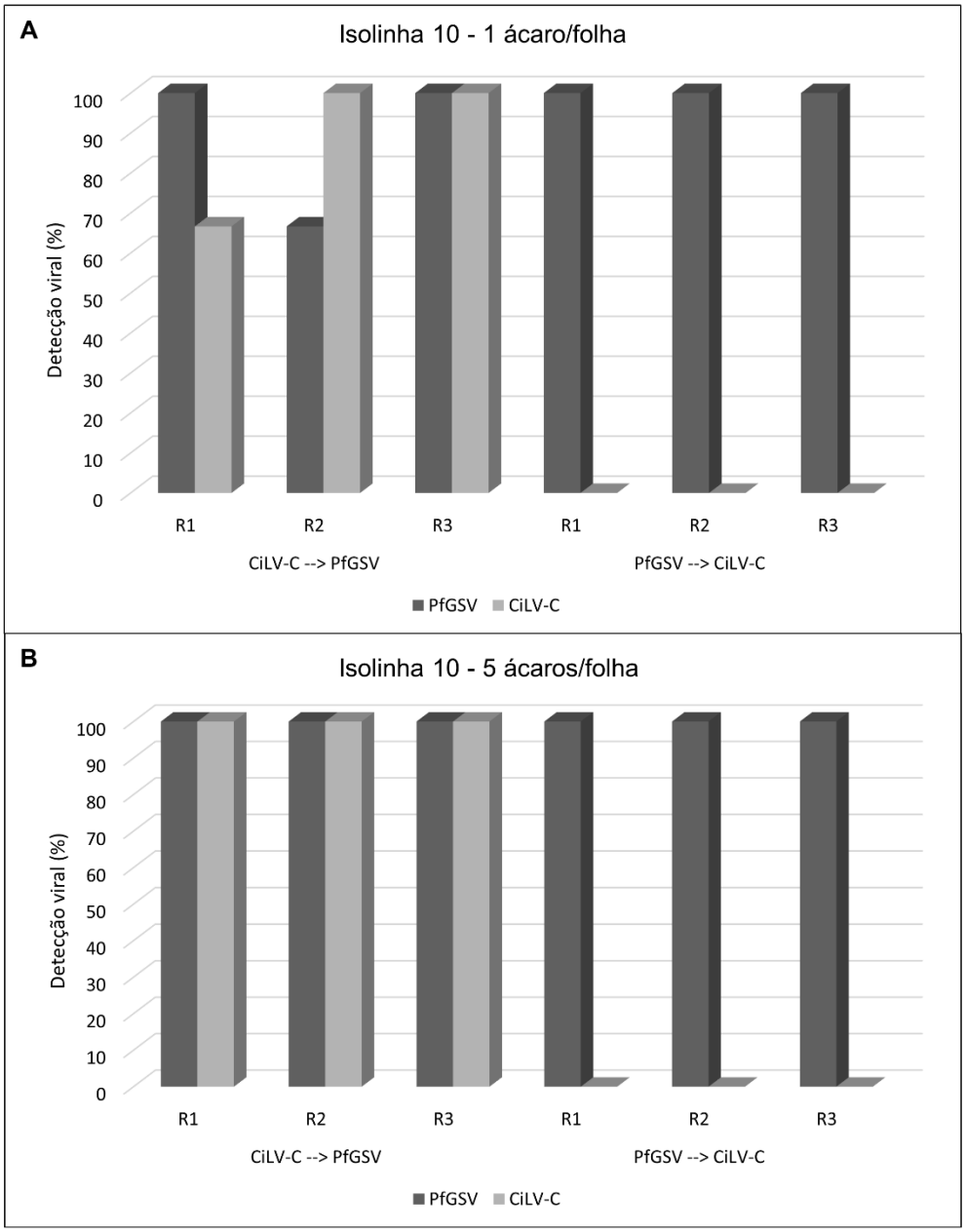


Figura 9: Porcentagem de detecção dos vírus PfGSV e CiLV-C em ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 10, alimentados sucessivamente nas fontes de inóculo de cada vírus e retirados de folhas da planta-teste (*Dolichos lablab*) após cinco dias da inoculação, a qual foi feita com 1 ácaro/folha (**A**) e 5 ácaros/folha (**B**). R1, R2 e R3: repetições.

Em relação a isolinha 2, vale destacar aqui que a eficiência de transmissão de CiLV-C pela mesma, apresentou-se baixa, com valores de 20% para a eficiência de um único ácaro em transmitir o vírus, e de 65% ao avaliar a transmissão por um grupo de 15 ácaros.

Ao analisar os ácaros da isolinha 2 e as folhas inoculadas com os mesmos, após sua alimentação em frutos sintomáticos de laranja e posteriormente em folhas lesionadas de alfeneiro, pode-se detectar apenas a presença de PfGSV (Figuras 8,

9, 10 e 14). Isto indica que esta isolinha está mais adaptada a transmissão de PfGSV, apresentando baixa eficiência de transmissão de CiLV-C, quando comparada a sua eficiência para transmissão de PfGSV (capítulo 4).

Nesta mesma isolinha, após alimentação dos ácaros na fonte de inóculo de PfGSV, seguida da alimentação na fonte de inóculo de CiLV-C, pode-se verificar a presença de PfGSV nos ácaros e folhas analisados (Figuras 11, 12, 13 e 14). Em apenas um ácaro não foi possível detectar este vírus, o que pode ter ocorrido em virtude de algum erro durante a extração do RNA total (Figura 11). Nesta situação, ao analisar um grupo de ácaros, pode-se detectar a presença de CiLV-C em dois momentos (Figuras 12 e 14), mas assim como mencionado anteriormente, isto pode ter ocorrido pela alimentação de um ou outro ácaro apenas na fonte de inóculo de CiLV-C, já que esta análise foi realizada com um pool de ácaros. No entanto, não foi possível a detecção de CiLV-C em nenhuma das folhas inoculadas (Figura 13), o que indica que embora possa ocorrer a aquisição deste vírus por esta isolinha, a sua capacidade de transmissão do mesmo é muito baixa.

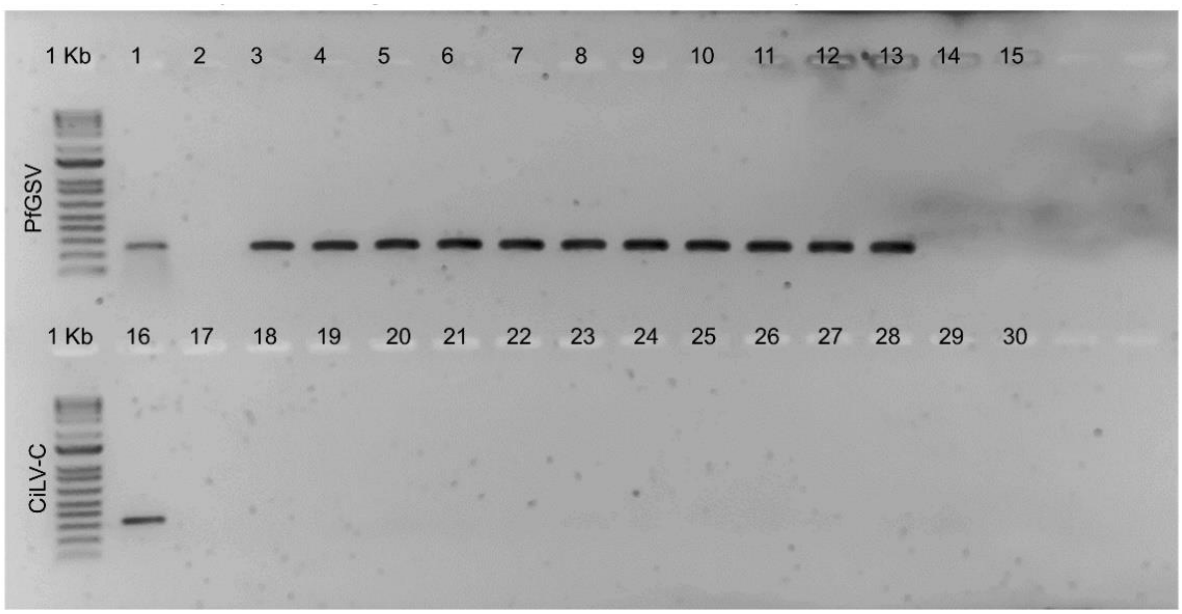


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um ácaro, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 16: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 17: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 2; Colunas 3, 4, 5, 18, 19 e 20: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 6 e 21: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 7, 8, 22 e 23: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 9 e 24: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 10, 11, 12, 25, 26 e 27: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 13 e 28: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 14 e 29: controle dos reagentes da PCR; Colunas 15 e 30: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

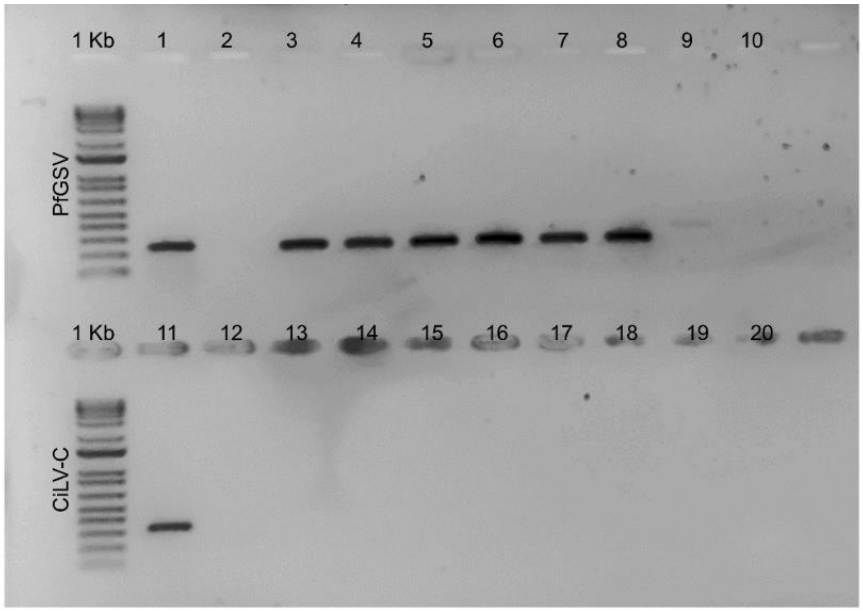


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um grupo de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 11: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 12: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 2; Colunas 3, 4, 5, 13, 14 e 15: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 6, 7, 8, 16, 17 e 18: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 9 e 19: controle dos reagentes da PCR; Colunas 10 e 20: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

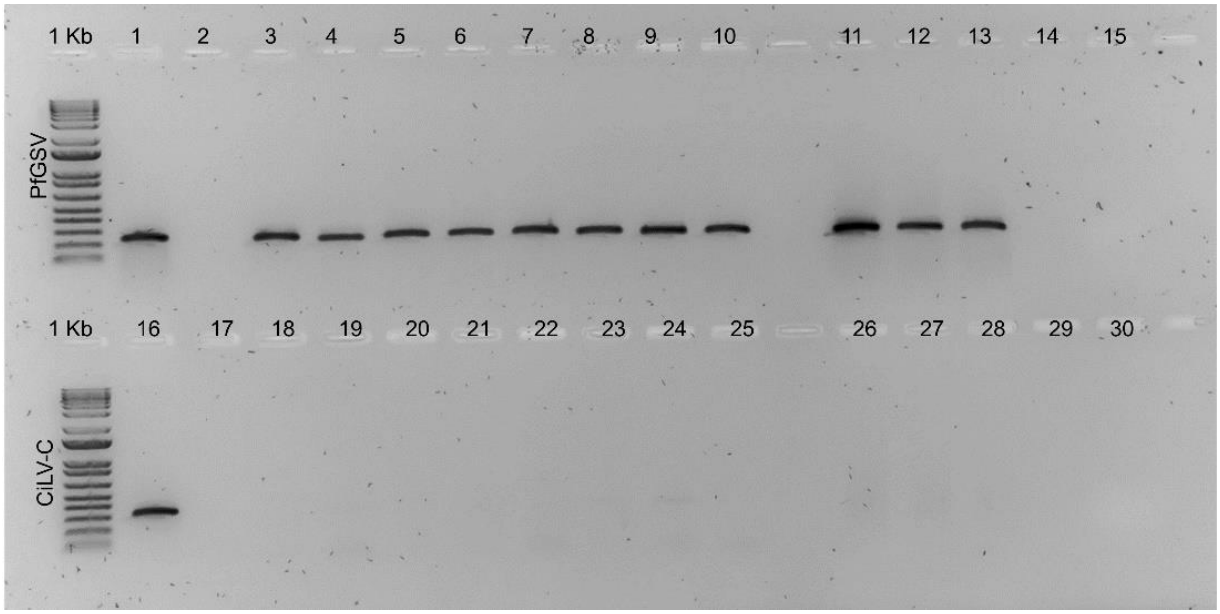


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em folhas de *Dolichos lablab*, inoculadas com ácaros virulíferos da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra) e posteriormente em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 16: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 17: controle negativo – folha saudável de *D. lablab*; Colunas 3, 4, 5, 18, 19 e 20: folhas sintomáticas da primeira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 6, 7, 21 e 22: folhas sintomáticas da segunda repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 8, 9, 10, 23, 24 e 25: folhas sintomáticas da terceira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 11, 12, 13, 26, 27 e 28: folhas sintomáticas da primeira, segunda e terceira repetições, inoculadas com um grupos de ácaros, extraídas em um pool de lesões; Colunas 14 e 29: controle dos reagentes da PCR; Colunas 15 e 30: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

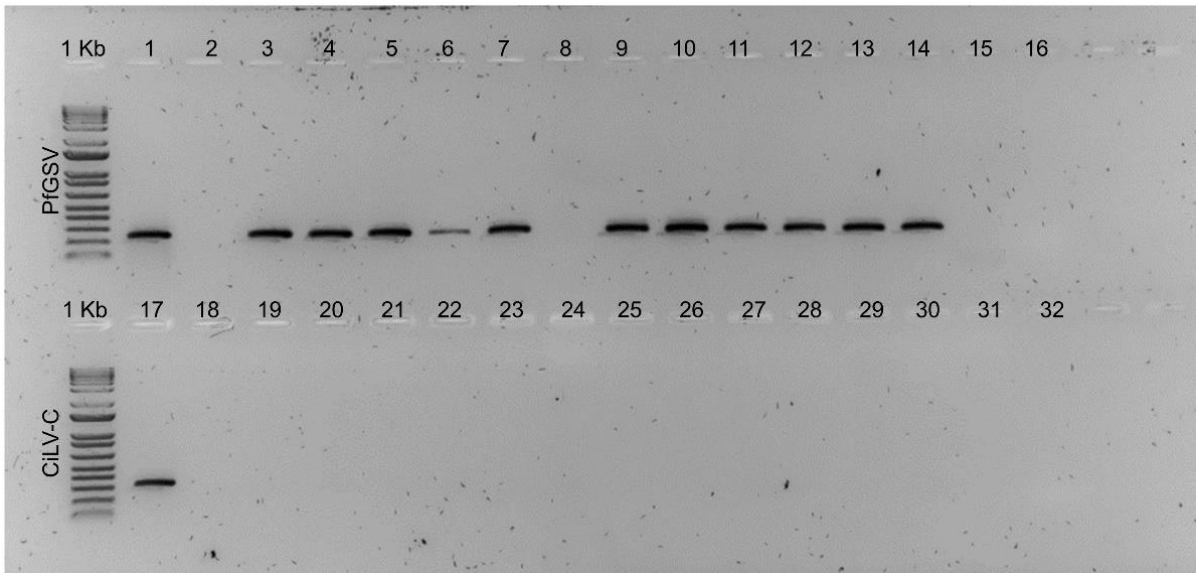


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um ácaro, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 2; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 6 e 22: ácaros da primeira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 7, 8, 9, 23, 24 e 25: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 10 e 26: ácaros da segunda repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 11, 12, 13, 27, 28 e 29: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 14 e 30: ácaros da terceira repetição, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos individualmente; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

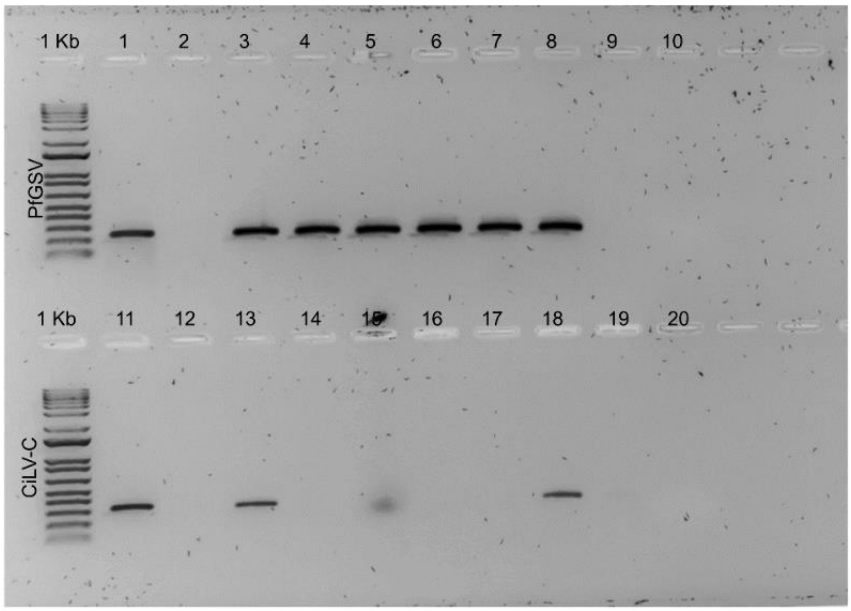


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em um grupo de ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 11: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 12: controle negativo - ácaros avirulíferos da isolinha 2; Colunas 3, 4, 5, 13, 14 e 15: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, respectivamente, retirados de folhas sintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 6, 7, 8, 16, 17 e 18: ácaros da primeira, segunda e terceira repetições, retirados de folhas assintomáticas da planta teste, extraídos em um pool de ácaros; Colunas 9 e 19: controle dos reagentes da PCR; Colunas 10 e 20: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

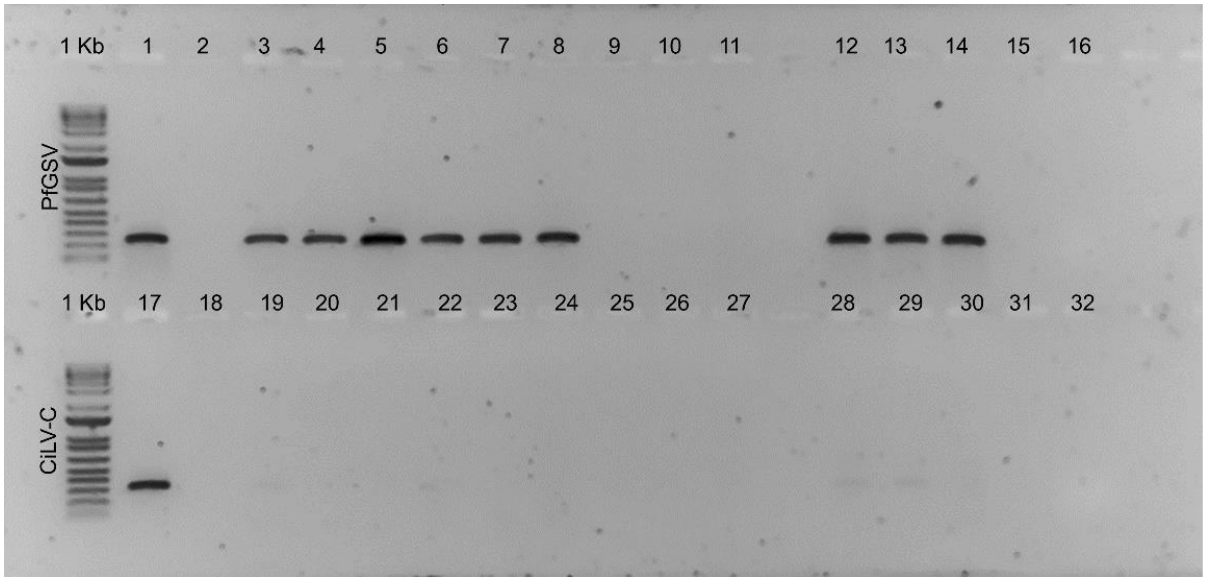


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV (245 pb) e do gene p24 de CiLV-C (322 pb) em folhas de *Dolichos lablab*, inoculadas com ácaros virulíferos da isolinha 2 utilizada nos estudos, após alimentação do vetor em folhas sintomáticas de alfeneiro (*Ligustrum sinense*) e posteriormente em frutos sintomáticos de laranja (*Citrus sinensis* cv. Pêra), visando avaliar a possibilidade de co-transmissão destes cilevirus. Colunas 1 e 17: controle positivo, folhas sintomáticas de alfeneiro e frutos de laranja, respectivamente, utilizados como fonte de inóculo; Colunas 2 e 18: controle negativo – folha saudável de *D. lablab*; Colunas 3, 4, 5, 19, 20 e 21: folhas sintomáticas da primeira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 6, 7, 8, 22, 23 e 24: folhas sintomáticas da segunda repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 9, 10, 11, 25, 26 e 27: folhas sintomáticas da terceira repetição, inoculadas apenas com um ácaro, extraídas individualmente; Colunas 12, 13, 14, 28, 29 e 30: folhas sintomáticas da primeira, segunda e terceira repetições, inoculadas com um grupos de ácaros, extraídas em um pool de lesões; Colunas 15 e 31: controle dos reagentes da PCR; Colunas 16 e 32: água utilizada na PCR; 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

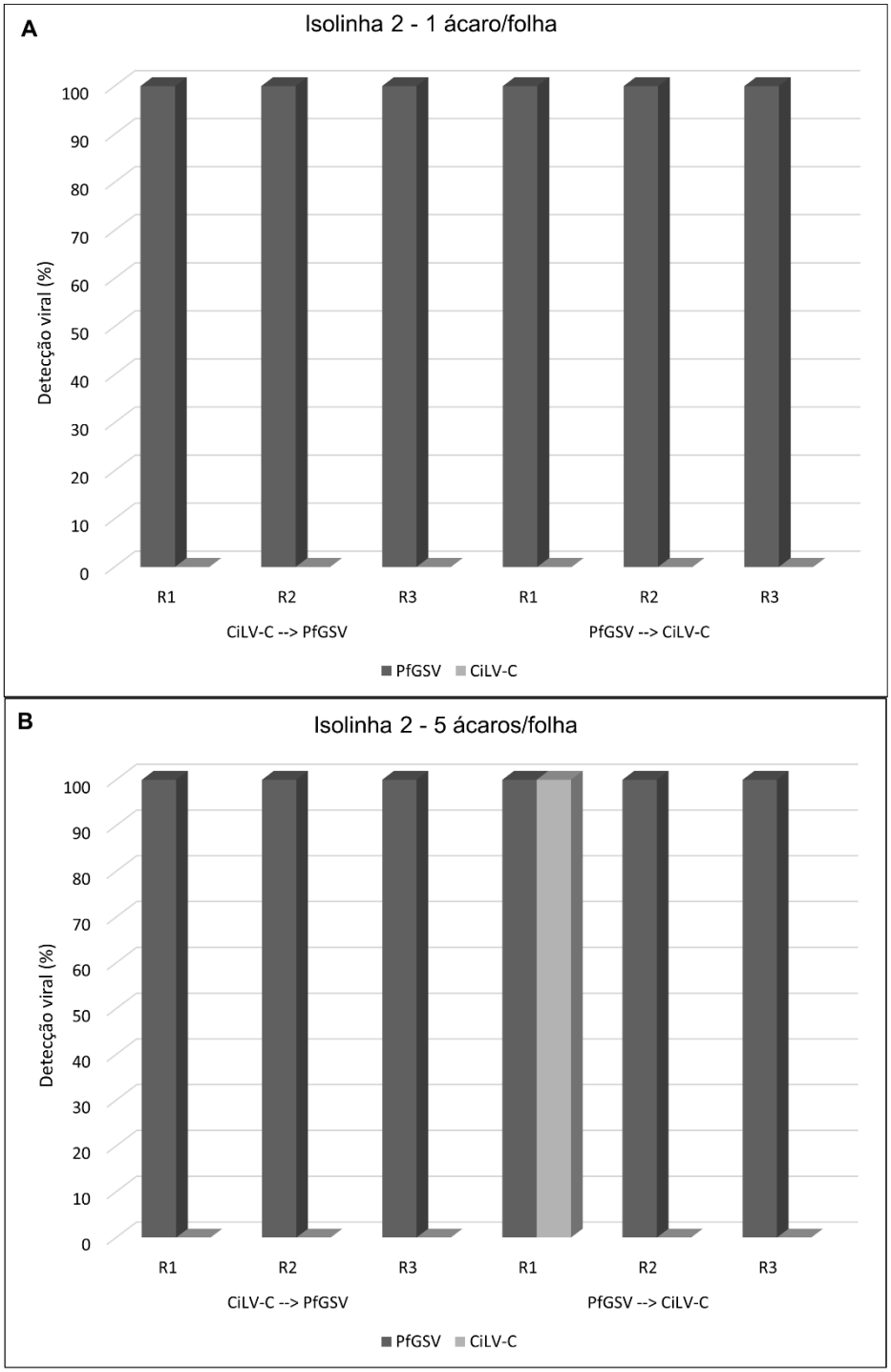


Figura 16: Porcentagem de detecção dos vírus PfGSV e CiLV-C em ácaros, *Brevipalpus yothersi*, da isolinha 2, alimentados sucessivamente nas fontes de inóculo de cada vírus e retirados de folhas da planta-teste (*Dolichos lablab*) após cinco dias da inoculação, a qual foi feita com 1 ácaro/folha (**A**) e 5 ácaros/folha (**B**). R1, R2 e R3: repetições.

Pode-se dizer então que não há co-transmissão eficiente de PfGSV e CiLV-C por um mesmo ácaro, assim como por um grupo de ácaros, por nenhuma das isolinhas aqui utilizadas. No entanto, fica claro que a isolinha 10 é capaz de adquirir os dois cilevirus aqui testados, desde que os ácaros se alimentem primeiramente na

fonte de inóculo de CiLV-C. Esse resultado indica que após alimentação dos ácaros em *L. sinense*, e consequente aquisição de PfGSV, em virtude de algum composto da planta ou pela alta concentração deste vírus, os ácaros parecem não se alimentar nas laranjas ou se alimentam, mas não conseguem adquirir outro vírus.

Além disso, esse resultado sugere também que pode haver receptores na superfície das células intestinais de *B. yothersi* que reconhecem tanto PfGSV como CiLV-C, permitindo sua internalização. Entretanto, os receptores seriam distintos para cada um dos vírus. Vírions de CiLV-C são reconhecidos apenas por receptores para este vírus, mas os de PfGSV são reconhecidos por ambos os receptores. Assim, quando ingerido, CiLV-C é reconhecido por seus receptores, que permitem sua internalização. Já vírions de PfGSV são reconhecidos por receptores para PfGSV e CiLV-C. Com isso, quando ingerido primeiro, bloqueiam todos os receptores, tanto para PfGSV como para CiLV-C, e o CiLV-C ingerido depois, não tem mais receptores disponíveis para permitir sua internalização. Quando ingerido primeiro, CiLV-C é reconhecido pelos seus receptores específicos, sendo internalizado, mas deixa receptores para PfGSV livres, para que estes se internalizem (Figura 15).

A internalização neste caso ocorreria a nível de intestino médio, mediada pela liberação de uma proteína com a função de abrir temporariamente as junções septadas do epitélio intestinal, como ocorre com a zonulina no intestino humano (STURGEON; FASANO, 2012; FASANO, 2016), permitindo a passagem dos vírions via paracelular (Figura 15). A via paracelular parece ser a utilizada pelos cilevirus para sua circulação no vetor (KITAJIMA; ALBERTI, 2014; TASSI et al., 2022), a qual, de acordo com Tassi et al. (2022) deve envolver a manipulação de junções septadas para que os vírions passem pelo epitélio do intestino médio e glândula podocefálica anterior até atingirem o canal salivar, o que corrobora com o sugerido neste trabalho.

Mecanismo similar deve ocorrer para a saída dos vírus do celoma para o canal estiletar. Neste caso, ainda que CiLV-C e PfGSV sejam internalizados, PfGSV é que será transmitido.

Quanto a isolinha 2, que não se mostrou capaz de adquirir eficientemente CiLV-C em nenhuma das situações testadas, os ácaros parecem ter apenas receptores para PfGSV, não permitindo a internalização de CiLV-C. Os casos positivos de CiLV-C encontrado neste estudo, em ácaros da isolinha 2, pode tratar-

se de um erro experimental como mencionado anteriormente ou causado por algum mutante desta isolinha presente na colônia.

A presença de receptores no intestino do vetor e a manipulação das junções septadas em ácaros *Brevipalpus* spp. necessita de maiores estudos para confirmação da hipótese aqui levantada, podendo também fornecer maiores informações que auxiliarão na compreensão da especificidade ácaro/vírus.

Ademais, como a aquisição de mais de um cilevirus por um único ácaro da isolinha 10 mostrou-se factível, caso ocorra multiplicação dos mesmos no vetor, o que se suspeita, há risco potencial de recombinação dos vírus no vetor. Além disso, a recombinação em uma planta hospedeira comum a PfGSV e CiLV-C também pode ocorrer, desde que os dois vírus estejam presentes na mesma célula ou em células vizinhas, mesmo que a inoculação ocorra em momentos distintos, mas temporalmente próximos.

A variação genética nos fitovírus ocorre através de eventos de mutação, recombinação e pseudorecombinação, sendo a mutação o mais importante (GARCÍA-ARENAL et al., 2003; SEAL et al., 2006). No entanto, em vírus de RNA a taxa de recombinação pode ser tão alta quanto a de mutação (GARCÍA-ARENAL et al., 2003). Considerando um vírus com genoma segmentado, como é o caso de PfGSV e CiLV-C, que apresentam genoma constituído de RNA de fita simples, senso positivo e bissegmentado (PASCON et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020), a pseudorecombinação, que nada mais é do que o rearranjo dos segmentos genômicos, pode exercer papel importante em sua evolução. Este evento é mais comum entre estirpes, mas pode ocorrer entre espécies distintas, que é o caso dos vírus em estudo (GARCÍA-ARENAL et al., 2003; MENDES, 2017).

Acredita-se que os kitavirus são originários da recombinação ou pseudorecombinação entre vírus de diferentes famílias, como *Virgaviridae* e *Bromoviridae* (QUITO-AVILA et al., 2020). Segundo Freitas-Astúa et al. (2018), os cilevirus provavelmente compartilham ancestralidade com os vírus de artrópodes do gênero *Negevirus*, e com base nisso, sugere-se que se originaram de vírus de artrópodes que tinham plantas como seus intermediários, ou vetores. Além disso, sabe-se que a relação vírus-vetor para cilevirus é do tipo persistente circulativa, no entanto, ainda não se sabe ao certo se os vírus são capazes de se multiplicar no vetor, havendo dados controversos sobre este ponto (ROY et al., 2015; TASSI et al., 2017). Estas informações sobre a possível origem dos cilevirus, aliadas a

possibilidade de uma multiplicação no vetor, corroboram para que a ocorrência de eventos de recombinação no ácaro vetor seja válida.

Estudos que esclareçam esta questão fazem-se de suma importância, tendo em vista que estes eventos podem resultar em variantes com novas características de patogenicidade, agravando os sintomas da doença, além de quebrar genes de resistência e até mesmo infectar novas espécies (SEAL et al., 2006; CHAVES-BEDOYA et al., 2014). Neste último caso, vale lembrar que ambos os vírus aqui estudados já apresentam uma grande gama de hospedeiros (capítulo 2; GARITA et al., 2014; SAITO, 2020). Além disso, sabe-se que o desenvolvimento de algumas epidemias e surgimento de novas fitoviroses foram resultado de alguns recombinantes (ROCHA, 2011).

O surgimento de recombinantes em cilevirus torna-se preocupante principalmente para o patossistema da leprose dos citros, tendo em vista que esta é a principal virose da citricultura brasileira atualmente, sendo responsável por grandes prejuízos aos citricultores (BASSANEZI, 2019). Com isso, os dados aqui obtidos tornam-se um alerta para um possível evento de recombinação entre os cilevirus, e também fornece informações para o estabelecimento de medidas mais eficientes de controle, como a retirada de qualquer hospedeiro alternativo de PfGSV ou de CiLV-C da área de cultivo.

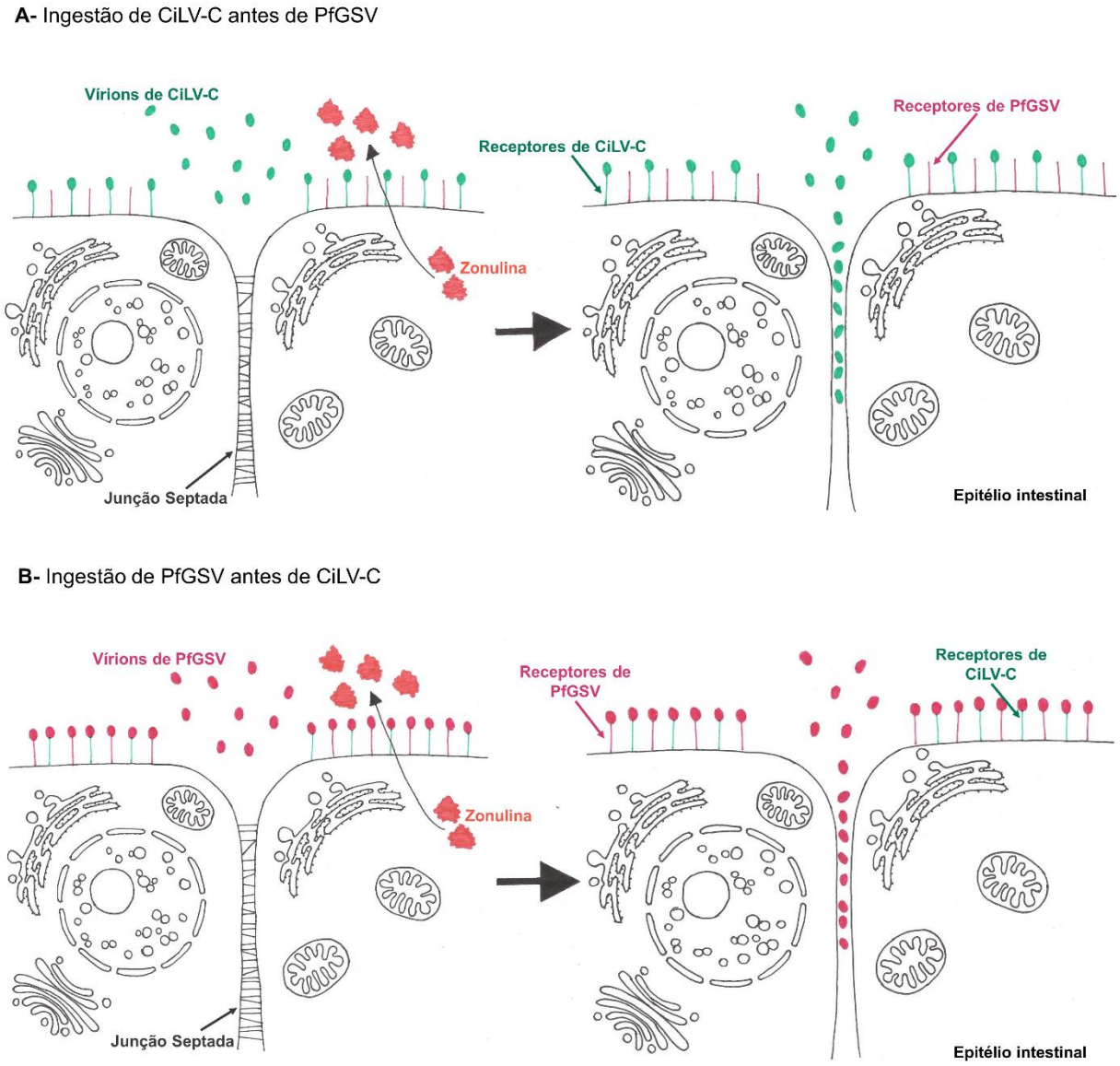


Figura 17: Representação hipotética da internalização de CiLV-C (**A**) e PfGSV (**B**) a nível de intestino médio de *Brevipalpus yothersi*. **A:** Ao ocorrer o reconhecimento dos vírions de CiLV-C pelos receptores específicos deste vírus, haverá liberação de zonulina ou outra proteína com função similar, que ocasionará abertura temporária da junção septada, permitindo a internalização dos vírions. Se houver ingestão posterior de PfGSV, como os receptores deste vírus estão disponíveis, haverá a reabertura da junção septada. **B:** Após alimentação de *B. yothersi* na fonte de inóculo de PfGSV os vírions serão reconhecidos pelos receptores presentes no intestino médio. Neste caso, o reconhecimento se dá tanto pelos receptores de PfGSV quanto pelos de CiLV-C, havendo saturação dos receptores pelos vírions de PfGSV. A zonulina será liberada, induzida pelo reconhecimento dos vírions pelos receptores, ocasionando a abertura da junção septada com consequente internalização dos vírions. Devido a saturação dos receptores pelo PfGSV, caso CiLV-C seja posteriormente ingerido, não ocorrerá seu reconhecimento, o que impede a internalização de CiLV-C.

5.4 Conclusão

Não houve co-transmissão eficiente de CiLV-C e PfGSV pelas duas colônias isolinhas de *B. yothersi* utilizadas no estudo. Sendo possível apenas a verificação de

que a isolinha 10 é capaz de adquirir ambos os vírus, desde que os ácaros se alimentem primeiramente na fonte de inóculo de CiLV-C.

Além disso, levanta-se aqui a hipótese de que a internalização dos vírions de CiLV-C e PfGSV pelo ácaro vetor ocorre mediada pela presença de receptores no epitélio intestinal, os quais podem ser saturados por PfGSV, caso este seja ingerido primeiro, impedindo a posterior internalização de CiLV-C. A internalização neste caso envolveria também a liberação de uma proteína capaz de permitir a abertura temporária das junções septadas para passagem dos vírions.

Referências

BASSANEZI, R.B. **Manual de leprose dos citros: medidas essenciais de controle**. 3. ed. Araraquara: Fundecitrus, 23 p., 2019.

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

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

CHAVES-BEDOYA, G.; CUBILLOS, K.; GUZMÁN-BARNEY, M. First fo recombination in Potato yellow vein virus (PYVV) in Colombia. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 234-241, 2014.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

DIETZGEN, R.G.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; GOODIN, M.M.; KONDO, H. TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Dichorhaviruses in their host plants and mite vectors. **Advances in Virus Research**, v. 102, p. 119-148. 2018.

FASANO, A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, p. 25-33, 2012.

FREITAS-ASTÚA, J.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; ARENA, G.D.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion In Virology**, v. 33, p. 66-73, 2018.

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations, **International Microbiology**, v. 6, p. 225-232, 2003.

GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; ROMÃO, G.O.; KITAJIMA, E.W. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 27–39, 2014.

KITAJIMA, E. W.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Acrinotrichida) Part 7. Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus* transmitted viruses. **Zoologica**, v. 160, p. 173-192. 2014.

KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of Brevipalpus mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Acrinotrichida) Part 1. An update on the biology and economical importance of Brevipalpus mites. **Zoologica**, v. 160, p. 1-10, 2014.

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

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, denomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis vírus, cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

MENDES, A.L.S.F. **Variabilidade e estrutura genética de populações do Begomovirus Cnidoscolus mosaic leaf deformation virus (CnMLDV) infectando *Cnidoscolus urens* (L.) Arthur (casanção)**. 2017. 70 p. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2017.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.I.; FRANCO, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.L.; FRANCHISCINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated vírus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Virus Genes**, v. 32, p. 289-298, 2006.

QUITO-AVILA, D.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; MELZER, M.J. Bluner-, Cile- and Higreviruses (Kitaviridae). **Reference Module in Life Sciences**, 5 p., 2020.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BRETON, M.C.; ARENA, G.D.; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus* C. **Viruses**, v. 8, p. 153-177, 2016.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 16 p., 2020.

ROCHA, C.S. **Variabilidade e estrutura genética de populações de Begomovírus em tomateiro e plantas daninhas em seis localidades do sudeste brasileiro.** 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), UFV, Viçosa, 2011.

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

SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M.J. Factors influencing Begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 23-46, 2006.

SAITO, M.S.G. **O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissues Barries**, v. 4, 19 p., 2016.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, p. 227-241. 2017.

TASSI, A.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Diferencial transmission of citrus leprosis virus C strains by *Brevipalpus yothersi* subpopulations. **Anais 52 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, p. 169, 2021.

TASSI, A.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SINICO, T.E.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Circulative transmission of cileviruses in *Brevipalpus* mites may involve the paracellular movement of virions. **Frontiers in Microbiology**, v. 13:836743, 11 p., 2022.

6 DETERMINAÇÃO DOS PERÍODOS DE ACESSO PARA AQUISIÇÃO (PAA) E DE ACESSO À INOCULAÇÃO (PAI) NA RELAÇÃO VÍRUS-VETOR DE *Passion fruit green spot virus*/*Brevipalpus yothersi*

Resumo

A pinta verde do maracujazeiro é uma virose ocasionada pelo cilevirus passion fruit green spot virus (PfGSV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker, descrito originalmente infectando maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). O sintoma característico desta doença em maracujazeiro é visível como manchas/pintas verdes em frutos maduros que resultam na depreciação do produto para o comércio *in natura*, e também, como áreas verdes em folhas senescentes ao longo das nervuras. Em infecções severas, lesões necróticas nos caules podem resultar na morte da planta. A pinta verde do maracujazeiro foi descrita pela primeira vez no final da década de 90, mas apenas recentemente o genoma completo de PfGSV foi sequenciado, resultando em sua inclusão no gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*. Embora venha sendo estudado há algum tempo, pouco se sabe sobre este patossistema, principalmente, quanto a relação vírus/vetor, se é semelhante ou não a de CiLV-C (*Citrus leprosis virus C*), espécie-tipo deste gênero e transmitida pelo mesmo vetor. No presente trabalho procurou-se determinar os períodos de acesso para aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI) para o patossistema da pinta verde do maracujazeiro, informação fundamental para entendimento da epidemiologia desta doença. Para determinação do PAA, ácaros adultos foram postos a se alimentar na fonte de inóculo, onde permaneceram por diferentes períodos e, posteriormente, foram transferidos para folhas da planta teste (*Dolichos lablab* L.). Para o estabelecimento do PAI, ácaros virulíferos foram mantidos em folhas da planta teste e retirados em diferentes períodos. Verificou-se que o período necessário para que *B. yothersi* adquira (PAA) e inocule (PAI) o PfGSV é de pelo menos 1 e 12 horas, respectivamente.

Palavras-chave: Pinta verde do maracujazeiro, Maracujá-amarelo, Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

Abstract

The passion fruit green spot virus (PfGSV) is caused by the passion fruit green spot virus (PfGSV), transmitted by the mites *Brevipalpus yothersi* Baker, and was originally found infecting the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). The characteristic symptom of this disease is visible mature fruits as green spots resulting in the product being devalued for the in natura market. Additionally, senescent yellow leaves presents green áreas along the veins. In severe cases, necrotic lesions on the stems may result in the death of plants. The passion fruit green spot was described for the first time in the late 1990s, however, only recently the complete genome of PfGSV was sequenced, allowing its inclusion in the genus *Cilevirus*, family *Kitaviridae*. Little is known yet about PfGSV pathosystem, especially regarding the virus/vector relationship, whether or not it is similar to that of CiLV-C (*Citrus leprosis virus C*), the type species of this genus and transmitted by the same vector. In the present work attempts were made to determine the acquisition access period (AAP) and inoculation access period (IAP) for the passion fruit green spot

pathosystem. This information is fundamental to understanding the epidemiology of this disease. To determine AAP, adult mites were fed in the inoculum source, where they remained for different periods and, later, they were transferred to the leaves of the test plant (*Dolichos lablab* L.). As for the establishment of IAP, viruliferous mites were kept on test plant leaves and removed at different times. The period required for *B. yothersi* to acquire (AAP) and inoculate (IAP) PfGSV was at least 1 and 12 hours, respectively.

Keywords: Passion fruit green spot, Yellow passion fruit, *Brevipalpus*-Transmitted Viruses, *Cilevirus*, *Kitaviridae*.

6.1 Introdução

Passion fruit green spot virus (PfGSV) é o agente causal da pinta verde do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). É um vírus pertencente ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae* (KITAJIMA et al., 1997; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). Assim como os demais vírus pertencentes a este gênero, comumente conhecidos como VTB (Vírus Transmitidos por *Brevipalpus*), PfGSV é transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus*, sendo *B. yothersi* Baker a espécie reconhecida como vetora (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LILLO et al., 2021), e parece não se movimentar sistemicamente na planta, mantendo-se restrito ao ponto de alimentação do vetor. A doença por ele ocasionada, possivelmente por isolados mais severos, foi relatada pela primeira vez em 1997 no estado de São Paulo, quando destruiu alguns pomares devido à alta incidência. Atualmente, predominariam isolados mais brandos de PfGSV infectando maracujazeiros, sendo de importância secundária para esta cultura (FISHER; REZENDE, 2021). Contudo, dado seu potencial destrutivo, como verificado no passado (KITAJIMA et al., 1997), deve ser monitorado e mantido em controle nos pomares. Até o momento, PfGSV em maracujazeiros, encontra-se restrito a alguns estados brasileiros, não havendo relatos de sua ocorrência em outros países (KITAJIMA et al., 2003; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

Conhecimentos sobre a relação vírus-vetor são importantes para compreensão da epidemiologia das doenças ocasionadas por estes patógenos, bem como para o estabelecimento de medidas eficientes de controle. Embora avanços significativos, sobre as relações vírus-vetor de alguns VTBs, tenham sido obtidos nos últimos anos, em especial, sobre o patossistema da leprose dos citros, ocasionada pelo cilevirus citrus leprosis virus C (CiLV-C) (TASSI et al., 2017),

informações sobre este tema são limitadas em relação ao patossistema PfGSV/*B. yothersi*. O objetivo do presente trabalho foi determinar, através de inoculações em folhas da planta indicadora, *Dolichos lablab* L., os períodos de acesso para aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI) para o patossistema da pinta verde do maracujazeiro.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Colônia de *Brevipalpus yothersi*

Utilizou-se no presente trabalho uma das isolinhas de ácaros, previamente identificados como espécimes de *B. yothersi* de acordo com Beard et al. (2015), que apresentou os melhores resultados quanto a transmissão de PfGSV e o melhor desenvolvimento nas condições de laboratório. A isolinha utilizada foi a isolinha 2 (ver capítulo 4).

Os ácaros foram mantidos em condições controladas (fotoperíodo de 14 horas, temperatura de 25 ºC e umidade relativa de 60-70%) em folhas destacadas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC).

6.2.2 Fonte de inóculo

Utilizou-se como fonte de inóculo do vírus PfGSV, folhas de alfeneiro (*Ligustrum sinense* Lour.) com sintomas típicos da infecção por este vírus (manchas ou anéis cloróticos), coletadas em parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba - SP. Este isolado do vírus acha'/-se identificado como BSB1 (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020), que apresenta alta similaridade (RNA1 > 99,1% e RNA2 > 97,3%) com o isolado Snp1 de PfGSV, tido como referência para a espécie.

Embora maracujá-amarelo seja o hospedeiro principal deste vírus, optou-se por utilizar o isolado de *L. sinense*, devido aos seguintes fatores: a infecção de alfeneiros pelo PfGSV é frequente, e assim pode-se sempre dispor de inóculo para os experimentos; os ácaros utilizados nos ensaios alimentaram-se bem nesta hospedeira; os sintomas da infecção por este vírus em maracujá só são visíveis quando a folha se encontra em processo de senescência, o que inviabiliza a alimentação dos ácaros nesta fonte de inóculo por mais de dois dias. Além disso, em ensaios prévios pode-se observar que os ácaros utilizados não se adaptam bem às folhas sintomáticas de maracujá.

A presença de PfGSV na fonte de inóculo foi comprovada por ensaios prévios de RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), usando iniciadores específicos (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

6.2.3 Planta teste

Folhas destacadas de *D. lablab* foram utilizadas como planta indicadora para os experimentos, por esta espécie ter se mostrado, em experimentos preliminares (capítulo 3), altamente suscetível a infecção de PfGSV, exibindo lesões locais necróticas nas nervuras cinco dias após a inoculação.

As plantas foram produzidas em condições de casa de vegetação, até que o primeiro par de folhas estivesse totalmente expandido, o que ocorreu aproximadamente dez dias após o plantio, quando então as folhas foram destacadas e montadas em placas de Petri de 90 mm, sobre papel filtro umedecido e envoltas com algodão.

6.2.4 Período de acesso para a aquisição (PAA) de PfGSV

Um grande grupo de ácaros adultos foi posto a se alimentar sobre folhas sintomáticas de alfeneiro, para aquisição do vírus, e removidos em diferentes intervalos de tempo, quando então foram transferidos, em grupos de 15 ácaros, para folhas destacadas de *D. lablab*. A princípio, em experimento piloto, os tempos utilizados foram de 24, 48 e 72 horas. Ao observar o surgimento de sintomas após 24 horas, realizou-se o teste com intervalos menores de tempo: 1, 2, 4 e 8 horas.

Os ácaros permaneceram nas folhas da planta teste durante cinco dias, quando se realizou a avaliação, observando-se o surgimento ou não de lesões locais necróticas (sintoma característico da infecção de PfGSV em folhas de *D. lablab*). A avaliação ocorreu através da observação das folhas em microscópio estereoscópico de alta resolução Hirox, para que fosse possível verificar a presença de lesões, mesmo que muito pequenas e iniciais. As imagens obtidas nesta etapa foram registradas digitalmente. Na sequência, coletou-se alguns dos ácaros das folhas sintomáticas, sob microscópio estereoscópico, para realizar a extração de RNA total e subsequente teste de RT-PCR. Todas as folhas foram fotografadas com câmera digital e àquelas que apresentaram sintomas da infecção viral tiveram os pedaços de tecido próximos às lesões removidos, armazenados em freezer -80 °C e posteriormente, submetidos a extração de RNA total seguida de RT-PCR com

primers específicos, a fim de confirmar a presença de PfGSV. O teste de RT-PCR foi realizado com um pool de lesões e ácaros, separadamente.

O experimento foi realizado em triplicata, com 10 folhas por repetição, totalizando 30 folhas por tempo.

6.2.5 Período de acesso à inoculação (PAI) de PfGSV

Neste ensaio, um grande grupo de ácaros foi posto a se alimentar sobre a fonte de inóculo, onde permaneceram por um período de 72 horas, para a aquisição do vírus. A seguir, grupos de 15 ácaros foram transferidos para folhas da planta indicadora, deixando-os se alimentar por diferentes períodos: 12, 24 e 48 horas. Após cada tempo, os ácaros foram removidos e transferidos para outras folhas de *D. lablab*, as quais foram o controle deste ensaio visando a comprovação biológica de que houve a aquisição do vírus pelos ácaros. As folhas ficaram sob observação durante cinco dias, quando se realizou a avaliação conforme descrito para o PAA.

Intervalos menores de tempo não foram testados devido ao baixo número de folhas sintomáticas observadas no menor tempo avaliado.

O experimento foi realizado em triplicata, com 10 folhas por repetição, totalizando 30 folhas por tempo.

6.2.6 Ensaios de RT-PCR

Para detecção de PfGSV por RT-PCR nos ácaros e nas lesões presentes nas folhas foi realizada a extração de RNA total com “Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit” (Thermo Fisher Scientific). Para tal, o material de interesse foi macerado em nitrogênio líquido, no caso de folhas. Após a maceração, adicionou-se 400 µL de tampão CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) e as amostras foram então centrifugadas, em centrífuga refrigerada (4 °C), a 12.000 rpm (rotações por minuto) por 2 minutos. Na sequência, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e neste, adicionou-se uma mistura contendo 210 µL de viral lysis buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após a homogeneização das amostras, o próximo passo foi a incubação das mesmas a 56 °C durante 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionou-se às amostras 250 µL de etanol absoluto, realizou-se a homogeneização através da agitação em vortex, com posterior incubação das amostras em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram transferidas para as colunas do kit utilizado, que foram submetidas a centrifugação

(7.000 rpm por 1 minuto). Logo após, o material filtrado nas colunas foi descartado, adicionou-se 500 µL de wash buffer e realizou-se a centrifugação a 7.000 rpm por 1 minuto. Esta última etapa foi realizada duas vezes e posteriormente, as colunas, sem adição de nenhum reagente, foram centrifugadas à velocidade de 13.000 rpm por 1 minuto. Após isto, adicionou-se 30 µL de RNAse free water às colunas para eluição do RNA extraído. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 minuto, quando então foram centrifugadas a 13.000 rpm também por 1 minuto. Ao final desta etapa obteve-se o RNA total das amostras, que foi armazenado em freezer -80 °C.

No caso da extração de RNA total dos ácaros utilizados nos experimentos procedeu-se com a maceração dos mesmos em 100 µL de tampão CTAB. Após a maceração, adicionou-se mais 100 µL do tampão e a mistura contendo 250 µL de Lysei buffer, 5,88 µL de carrier RNA e 25 µL de proteinase K. Após isto, os próximos passos seguem conforme descrito anteriormente para a extração de folhas, realizando a eluição do RNA total com 30 µL de RNAse free water quando da extração de apenas um ácaro, e com 40 µL para a extração de um pool de ácaros.

Após a extração, 3 µL de cada amostra extraída foram utilizados para síntese de cDNA usando primers hexâmeros aleatórios e o kit “GoScript™ Reverse Transcriptase”, conforme recomendação do fabricante (Promega).

Para realização da PCR foram utilizados 5 µL de “GoTaq® Master Mixes” (Promega), 2,6 µL de Nuclease Free Water, 2 µL do cDNA obtido e 0,2 µL de cada primer utilizado, totalizando volume de 10 µL. Utilizou-se par de primers específico para detecção de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV: RNA2 F: 5’-CGATATTTGATCAATCCGTT-3’ e R: 5’-CACCTTAAAATTCGAGGGTT-3’ (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020). A amplificação do fragmento ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 35 segundos, 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 5 minutos. Os amplicons obtidos foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

6.3 Resultados e Discussão

O período de acesso para a aquisição (PAA) de PfGSV foi de 1 hora (Tabela 1): é necessário ao menos 1 hora de acesso à fonte de inóculo para que o vetor, *B. yothersi*, adquira o vírus. A detecção viral foi possível em todos os tempos testados, tanto nos ácaros quanto nas folhas sintomáticas da planta indicadora (Figura 1). Neste caso, pode-se verificar também que o número de folhas sintomáticas aumenta conforme aumenta-se o tempo de alimentação dos ácaros no inóculo (Tabela 1).

Embora o número de folhas com lesões locais necróticas tenha sido baixo, apenas seis folhas neste tempo, o período de acesso à inoculação (PAI) foi determinado como 12 horas (Tabela 2). Portanto, seriam necessários ao menos 12 horas de alimentação para que o vetor seja capaz de inocular o vírus em uma determinada planta. Pode-se detectar o vírus nas folhas e nos ácaros utilizados nos experimentos em todos os tempos testados (Figura 2).

Tabela 1: Determinação do período de acesso para aquisição (PAA) de PfGSV transmitido por *Brevipalpus yothersi*.

Tempo de Alimentação	N° de Folhas com Lesões*
1 hora	20
2 horas	25
4 horas	23
8 horas	29

*Lesões locais necróticas nas nervuras da planta indicadora (*Dolichos lablab*) eram observadas após cinco dias da inoculação das folhas com ácaros virulíferos. Avaliou-se 30 folhas por tempo.

Tabela 22: Determinação do período de acesso à inoculação (PAI) de PfGSV transmitido por *Brevipalpus yothersi*.

Tempo de Alimentação	N° de Folhas com Lesões*
12 horas	6
24 horas	4
48 horas	14

*Lesões locais necróticas nas nervuras da planta indicadora (*Dolichos lablab*) eram observadas após cinco dias da inoculação das folhas com ácaros virulíferos. Avaliou-se 30 folhas por tempo.

Como um cilevirus, esperava-se que os períodos determinados para PfGSV neste trabalho fossem similares aos estabelecidos para as outras espécies deste gênero. CiLV-C apresenta PAA de 4 horas e PAI de 2 horas (Tassi et al., 2017); CiLV-C2, possui PAA de 30 minutos e PAI de 10 minutos (LEÓN et al., 2016). No entanto, os períodos aqui descritos para PfGSV/*B. yothersi* são distintos, indicando

variações na relação vírus-vetor entre os diferentes cilevirus e seus vetores. Estas variações seriam explicáveis pelas diferenças biológicas e genéticas na população de ácaros utilizadas neste experimento e no realizado por Tassi et al. (2017) e LEÓN et al. (2016), pois sabe-se que existe diferença na taxa de transmissão de alguns VTBs por diferentes populações de *B. yothersi* (capítulo 4; TASSI, 2018; TASSI et al., 2021), bem como pela diversidade genética destes vírus.

Entretanto, esperava-se que o PAI de PfGSV fosse realmente superior ao de CiLV-C, pois em experimento preliminar, realizado por Saito (2020), foi possível observar resultados positivos a partir de 24 horas da alimentação dos ácaros na planta teste.

Os dados aqui obtidos sugerem que a relação vírus-vetor para PfGSV/*B. yothersi* parece ser do tipo persistente circulativa, conforme sugerido por Tassi et al. (2017) para CiLV-C/*B. yothersi*. O fato de o número de folhas sintomáticas aumentar conforme se aumenta o PAA e PAI corrobora este tipo de relação (MICHELOTTO; BUSOLI, 2007). Estudos complementares são necessários para determinação do período de latência deste vírus, sabendo-se que nestes experimentos este período parece ser de dias, o que tornaria este patossistema ainda mais distinto do CiLV-C, que apresenta período de latência de 7 horas (TASSI et al., 2017). Além disso, dados sobre a capacidade de transmissão de PfGSV pelas diferentes fases de vida do vetor, assim como a capacidade de retenção do vírus pelo ácaro, visando informações quanto a possibilidade de multiplicação do vírus no vetor, tornam-se relevantes para que se possa determinar com exatidão o tipo de relação vírus-vetor.

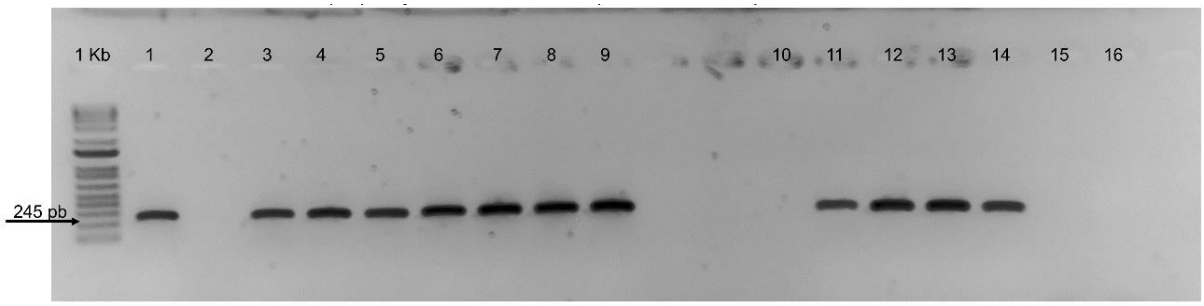


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em folhas de *Dolichos lablab* inoculadas com ácaros virulíferos, bem como a detecção deste gene nos ácaros utilizados para inoculação, visando confirmar a presença do vírus após diferentes tempos de alimentação na fonte de inóculo para aquisição de PfGSV pelos ácaros. Coluna 1: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Coluna 2: controle negativo, folha assintomática de *D. lablab*; Colunas 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9: folhas de *D. lablab* infectadas por PfGSV após inoculação com ácaros virulíferos, após 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas de alimentação dos ácaros na fonte de inóculo, respectivamente; Coluna 10: controle negativo, pool de ácaros avirulíferos; Colunas 11, 12, 13 e 14: ácaros virulíferos retirados das folhas sintomáticas de *D. lablab* que se alimentaram na fonte de inóculo por 1, 2, 4 e 8 horas, respectivamente; Coluna 15: controle dos reagentes da PCR; Coluna 16: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

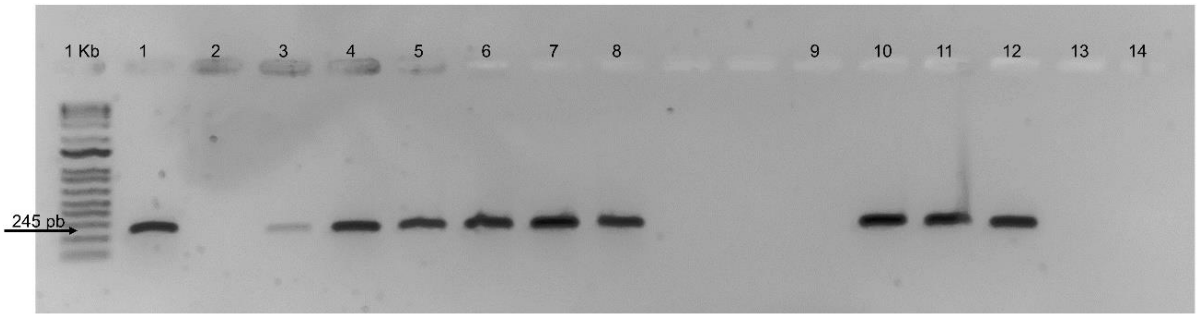


Figura 218: Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Detecção específica de um fragmento do gene da proteína de movimento (MP) de PfGSV em folhas de *Dolichos lablab* inoculadas com ácaros virulíferos, bem como a detecção deste gene nos ácaros utilizados para inoculação, visando confirmar a presença do vírus após diferentes tempos de acesso à inoculação de PfGSV pelos ácaros. Coluna 1: controle positivo, folhas sintomáticas de *Ligustrum sinense* utilizadas como fonte de inóculo; Coluna 2: controle negativo, folha assintomática de *D. lablab*; Colunas 3, 5 e 7: folhas de *D. lablab* infectadas por PfGSV após 12, 24 e 48 horas, respectivamente, de acesso à inoculação por ácaros virulíferos; Colunas 4, 6 e 8: folhas controle de *D. lablab* infectadas por PfGSV após inoculação com os ácaros retirados das folhas nos diferentes tempos: 12, 24 e 48 horas, respectivamente; Coluna 9: controle negativo, pool de ácaros avirulíferos; Colunas 10, 11 e 12: ácaros virulíferos retirados das folhas controle de *D. lablab* após terem acesso à inoculação durante 12, 24 e 48 horas, respectivamente; Coluna 13: controle dos reagentes da PCR; Coluna 14: água utilizada na PCR. 1Kb: marcador de peso molecular 1-kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

6.4 Conclusão

Os períodos de acesso para aquisição (PAA) e de acesso à inoculação (PAI) para *B. yothersi* adquirir e inocular PfGSV, resultando em lesões locais necróticas nas nervuras de folhas de *D. lablab*, foram de 1 e 12 horas, respectivamente.

Referências

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

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; SIMONI, S.; TASSI, A.D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, p. 439-462, 2021.

FISHER, I.H.; REZENDE, J.A.M. Manejo de doenças. In: BRUCKNER, C.H.; SANTOS, C.E.M.; BORÉM, A. **Maracujá: do plantio à colheita**. 1. ed. Viçosa: UFV, v. 1, cap. 8, p. 122-141, 2021.

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

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

LEÓN, G.; ROY, A.; CHOUDHARY, N.; BRLANSKY, R. Estudios sobre *Brevipalpus yothersi* Baker vector de virus de la leprosis de los citricos em Colombia. In: **Proceedings Congreso Latinamericano de Acarologia**, Montenegro, Colombia, v. 1, p. 99–101, 2016.

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

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.F.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 50-End of the RNA2 segment across cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 16 p., 2020.

SAITO, M.S.G. **O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***. 2020. 50 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2020.

TASSI, A.D. **Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus**. 2018. 263 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), ESALQ/USP, Piracicaba, 2018.

TASSI, A.D.; GARITA-SALAZAR, L.C.; AMORIM, L.; NOVELLI, V.M.; FREISTAS-ASTÚA, J.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, p. 227-241, 2017.

TASSI, A.D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Diferencial transmission of citrus leprosis virus C strains by *Brevipalpus yothersi* subpopulations. **Anais 52 Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, p. 169, 2021.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível a obtenção de 31 espécies hospedeiras de PfGSV, bem como a realização de transmissão mecânica deste vírus, de maneira consistente, utilizando-se solução tampão estabelecida por Colariccio et al. (1995) e folhas sintomáticas de maracujá-amarelo como fonte de inóculo.

Fica aqui estabelecida a espécie *D. lablab* como planta indicadora da infecção ocasionada por PfGSV para usos em experimentos futuros. Além disso, pode-se verificar que, a partir de sete dias após a inoculação com ácaros virulíferos, é possível a detecção de PfGSV em folhas assintomáticas de maracujá, através de RT-PCR.

Populações de *B. yothersi*, oriundas de diferentes locais e plantas hospedeiras, apresentam diferença significativa na capacidade de transmissão de PfGSV.

Nas condições estudadas, não foi possível verificar co-transmissão entre CiLV-C e PfGSV pelas colônias isolinhas de *B. yothersi* aqui utilizadas. No entanto, uma das isolinhas mostrou-se capaz de adquirir ambos os vírus, desde que alimentada primeiramente na fonte de inóculo de CiLV-C. Com isso, levanta-se a hipótese de que os vírions de CiLV-C e PfGSV podem ser internalizados pelo vetor mediante a ação de receptores presentes no epitélio intestinal. Nesta situação, possivelmente há a liberação de uma proteína capaz de realizar a abertura temporária das junções septadas permitindo a passagem dos vírions.

Ademais, verificou-se que o PAA e PAI para a relação PfGSV/*B. yothersi* é de 1 e 12 horas, respectivamente.

Os dados aqui obtidos fornecem informações que podem ser utilizadas para um manejo mais eficiente da pinta verde, como por exemplo, a eliminação de plantas hospedeiras do vírus da área de cultivo e o uso da planta indicadora para verificação de possíveis ácaros virulíferos no pomar. Além disso, estas informações auxiliam na compreensão da epidemiologia da doença, assim como no melhor entendimento da relação vírus-vetor para este patossistema.