



Caracterização de um novo agente causal associado a manchas cloróticas em citros

Mariane da Costa Rodrigues

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestra em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agrossistema.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO
PAULO AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE,
SEGURANÇA ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO

CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE CAUSAL ASSOCIADO A
MANCHAS CLORÓTICAS EM CITROS

MARIANE DA COSTA RODRIGUES

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestra em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio

SÃO PAULO

2022

MARIANE DA COSTA RODRIGUES

Bacharel em Ciências Biológicas

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE CAUSAL ASSOCIADO A
MANCHAS CLORÓTICAS EM CITROS**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestra em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Área de concentração: Segurança alimentar e sanidade no agroecossistema

Orientadora:

Dra. Juliana Freitas-Astúa

Coorientador:

Dr. Pedro Luis Ramos-González

SÃO PAULO

2022

Eu **Mariane da Costa Rodrigues**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Mariane C. Rodrigues Data: 17/10/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Rodrigues, Mariane da Costa.

Caracterização de um novo agente causal associado a manchas cloróticas em citros. / Mariane da Costa Rodrigues. - São Paulo, 2022.

87 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2022D.MR010

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Juliana de Freitas Astúa.

Versão do título para o inglês: Characterization of a new causal agent associated with chlorotic spots in citrus.

1. Clorose zonada dos citros 2. *Kitaviridae* 3. *Higrevirus* 4. *Brevipalpus* 5. HTS I. Rodrigues, Mariane da Costa II. Astúa, Juliana de Freitas III. González, Luis Ramos IV. Instituto Biológico (São Paulo) V. Título.

IB/Bibl./2022/010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mariane da Costa Rodrigues

Título: CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE CAUSAL ASSOCIADO A MANCHAS CLORÓTICAS EM CITROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestra em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovada em: 09/09/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (processo 2020/07026-9) concedida e pelo auxílio financeiro para a execução deste projeto (processo 2017/50222-0).

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida no período de março a setembro de 2020. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

Aos meus orientadores Dra. Juliana Freitas-Astúa e Dr. Pedro Luis Ramos-González pela oportunidade desde a iniciação científica, por toda orientação, disponibilidade, suporte, conhecimento, crescimento, confiança, paciência e pelas inúmeras sugestões e contribuições com o trabalho;

À Dra. Camila Chabi-Jesus pela imensa contribuição com o trabalho, sugestões, apoio, ensinamentos e paciência desde a iniciação científica;

Ao grupo de pesquisa de VTBs, especialmente aos Drs. Aline Tassi e Elliot Kitajima pela disponibilidade e contribuição com análises de amostras de MET, identificação e doação de populações de ácaros; e aos colegas Matheus Potsclam, Thaís Sinico e Laura Rossetto por toda contribuição e apoio;

Ao Dr. Ricardo Harakava pela disponibilidade e contribuição com sequenciamento Sanger e aos meus colegas da ULR em Biologia Molecular Aplicada pelo suporte e por serem tão receptivos;

Ao programa de pós-graduação do Instituto Biológico e aos professores por todos os ensinamentos nas disciplinas e aos colegas de turma do mestrado;

Aos colaboradores Dra. Cristiane Barbosa e MSc. Magno Guimarães da Embrapa Mandioca e Fruticultura; Dr. Hércio Costa do INCAPER; e Dra. Luana Castilho Maro da EPAGRI, pela disponibilidade, coleta e envio de amostras;

Aos Drs. Alice Nagata, Simone Ribeiro e Fábio Nascimento pelas contribuições e sugestões com o trabalho;

À Sra. Márcia Rebouças pela consulta do acervo do arquivo de memórias e aos Srs. Roberto e Dalva pelo envio dos artigos da biblioteca;

À minha família, especialmente meus pais Silvia e Joaquim, e aos meus irmãos Juan e Renan por acreditarem em mim, pelo apoio, incentivo, carinho e amor incondicional;

Ao meu namorado André, por acreditar em mim, por todo amor, carinho, apoio, paciência e incentivo, principalmente nos dias mais difíceis;

Aos meus amigos por todo apoio, desabafos e por fazer a vida ser mais leve;

A todos os que contribuíram de alguma forma com o meu trabalho.

RESUMO

RODRIGUES, Mariane. **Caracterização de um novo agente causal associado a manchas cloróticas em citros**. 2022. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2022.

Na década de 1930, a leprose dos citros (LC) e a clorose zonada dos citros (CZ), duas doenças que causam sintomas cloróticos e/ou necróticos em citros e que posteriormente tiveram sua transmissão associada a ácaros do gênero *Brevipalpus*, foram descritas no Brasil. No entanto, enquanto a LC é sabidamente causada por vários vírus dos gêneros *Cilevirus* e *Dichorhavirus* e é atualmente a principal doença viral que afeta a citricultura no país, a CZ parece ser de rara ocorrência e seu agente causal ainda permanece desconhecido. Neste trabalho estudamos amostras de citros com sintomas cloróticos semelhantes aos de LC e CZ, mas que resultaram negativas em ensaios de RT-PCR com iniciadores específicos para a detecção de vírus que causam LC. Entretanto, fragmentos de tamanho esperado foram obtidos com iniciadores degenerados para a detecção de membros da família *Kitaviridae*. As análises incluíram a identificação e caracterização dos vírus presentes em amostras de citros (*Citrus* spp.) do Espírito Santo, Bahia e Santa Catarina, coletadas entre 2016 e 2022, e a sua comparação com o possível agente causal da CZ descrito no século passado em amostras de citros conservadas no Herbário do Instituto Biológico, coletadas no estado de São Paulo entre os anos de 1933 e 1965. A partir do sequenciamento de alto rendimento (HTS) de amostras selecionadas foi possível identificar a presença do hibiscus green spot virus 2 (HGSV2) (gênero *Higrevirus*, família *Kitaviridae*), confirmando a relação causal entre esse kitavírus e a CZ. Os ensaios biológicos comprovaram a transmissão de isolados brasileiros do HGSV2 por *Brevipalpus papayensis* e *B. yothersi* através da infestação de plantas sadias de *Arabidopsis thaliana*. O presente trabalho, além de descrever a identificação do agente causal da CZ, relata pela primeira vez a presença de um higrevírus na América continental, amplia o conhecimento sobre a diversidade de kitavírus que afetam a produção de citros no Brasil, revela uma organização genômica distinta dentro do gênero *Higrevirus* e demonstra a transmissão vetorial de um de seus membros.

PALAVRAS-CHAVE: Clorose zonada dos citros. *Kitaviridae*. *Higrevirus*. *Brevipalpus*. HTS.

ABSTRACT

RODRIGUES, Mariane. **Characterization of a new causal agent associated with chlorotic spots in citrus**. 2022. Thesis (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2022.

In the 1930s, citrus leprosis (CL) and citrus zonate chlorosis (ZC), two diseases that cause chlorotic and/or necrotic symptoms in citrus and that later had their transmission associated with *Brevipalpus* mites, were described in Brazil. However, while CL is known to be caused by viruses of the genera *Cilevirus* and *Dichorhavirus* and is currently the main viral disease affecting citrus in the country, ZC seems to be of rare occurrence and its causative agent remains unknown. In this work, we studied citrus (*Citrus* spp.) samples with chlorotic symptoms similar to CL and ZC, but that resulted negative in RT-PCR assays using specific primers for the detection of viruses that cause CL. However, fragments of expected lengths were obtained using degenerate primers for the detection of members of the family *Kitaviridae*. We identified and characterized the viruses present in citrus samples from Espírito Santo, Bahia, and Santa Catarina, collected between 2016 and 2022 and determined their relationship with the putative causal agent of ZC last century in citrus samples conserved in the Herbarium of the Biological Institute, that were collected in São Paulo in the period 1933-1965. High throughput sequencing (HTS) of selected samples allowed identifying the presence of hibiscus green spot virus 2 (HGSV2) (genus *Higrevirus*, family *Kitaviridae*) confirming the causal relationship between this kitavirus and ZC. Biological assays proved the transmission of Brazilian isolates of HGSV2 by *Brevipalpus papayensis* and *B. yothersi* through the infestation of healthy *Arabidopsis thaliana* plants. The present work, besides describing the identification of the causal agent of ZC, reports for the first time the presence of a higrevirus in continental America, expands the knowledge about the diversity of kitaviruses that affect citrus production in Brazil, reveals a distinct genomic organization within the genus *Higrevirus*, and demonstrates the vectorial transmission of one of its members.

KEYWORDS: Citrus zonate chlorosis. *Kitaviridae*. *Higrevirus*. *Brevipalpus*. HTS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustrações científicas de folhas e frutos de <i>Citrus</i> sp. com sintomas de clorose zonada dos citros, realizadas por Joaquim Franco de Toledo na década de 1930.....	19
Figura 2: Folhas de <i>Citrus</i> spp. exibindo sintomas causados por VTBs e pelo kitavírus hibiscus green spot virus 2 (HGSV2).....	21
Figura 3: Figuras de microscopia eletrônica de transmissão com partículas de vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> (VTB)..	22
Figura 4: Organização genômica do blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), gênero <i>Blunervirus</i>	25
Figura 5: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de células de pericarpo de tomate infectadas com ToFBV indicando as partículas virais..	26
Figura 6: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de (A) seções ultrafinas de folhas de <i>Camellia sinensis</i> infectadas com o tea plant ring blotch virus (TPNRBV) e (B) folhas não infectadas.....	26
Figura 7: Organização genômica do citrus leprosis virus C (CiLV-C), gênero <i>Cilevirus</i>	28
Figura 8: Organização genômica do hibiscus green spot virus 2 (HGSV2), gênero <i>Higrevirus</i> ..	29
Figura 9: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de células de tecidos foliares de <i>C. volkameriana</i> infectadas com hibiscus green spot virus 2 (HGSV2)..	29
Figura 10: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do ácaro <i>Brevipalpus yothersi</i> ..	31
Figura 11: Frutos e folhas de <i>Citrus</i> spp. com sintomas cloróticos associados a CZ ou LC..	33
Figura 12: Localização das amostras de <i>Citrus</i> spp. analisadas neste trabalho.	34
Figura 13: Organograma geral de amostras e diferentes metodologias utilizadas.....	37
Figura 14: Folhas com manchas cloróticas em diferentes formatos..	51
Figura 15: Gel de agarose a 1% da detecção de kitavírus por RT-PCR em amostras de <i>Citrus</i> spp. utilizando um par de iniciadores degenerados que amplifica parte do gene <i>RdRp</i> de membros da família <i>Kitaviridae</i> ..	52
Figura 16: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de possíveis vírions em cortes ultrafinos de folhas de laranjeira Agridoce (<i>C. aurantium</i>) (CdA_10).....	52
Figura 17: Organização genômica do HGSV2 isolado DMs_01 em comparação com a do isolado de referência HAI_1-1.....	53
Figura 18: Filogenia dos vírus da família <i>Kitaviridae</i>	55
Figura 19: Organização do RNA3 do HGSV2 isolados do Brasil DMs_01 e do Havaí HAI_1-1..	56
Figura 20: Predição de domínios transmembranas das proteínas P33, P29, e P65 dos isolados de HGSV2.....	57
Figura 21: Gráficos de peptídeos sinais em isolados de HGSV2.....	58
Figura 22: Gel de agarose a 1% para detecção de HGSV2 com os iniciadores para o gene <i>RdRp</i> ..	59
Figura 23: Gel de agarose a 1% para detecção de HGSV2 com os iniciadores desenhados para o gene <i>binary moviment block</i> (BMB) do RNA2.....	60
Figura 24: Gel de agarose a 1% evidenciando a amplificação do genoma completo de HGSV2 de amostra CdA_09 de <i>C. clementina</i> proveniente de Cruz das Almas, BA, coletada em 2016 por RT-PCR.....	63
Figura 25: Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação de 540 pb da ORF p65 do RNA3 de HGSV2 de amostras de <i>Citrus</i> spp. e <i>Arabidopsis thaliana</i> com os iniciadores desenhados 2F e 2Ra com 540 pb.....	64

Figura 26: Micrografias de ácaros <i>Brevipalpus papayensis</i> e <i>B. yothersi</i> identificados em plantas de <i>Citrus</i> spp. coletadas em Cruz das Almas, BA, apresentando sintomas associados à clorose zonada..	65
Figura 27: Folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> com sintomas causados por HGSV2 após transmissão com ácaros <i>Brevipalpus</i> sp.	67
Figura 28: Gel de agarose a 1% de ensaios de RT-PCR evidenciando a transmissão do HGSV2 por ácaros <i>Brevipalpus</i> spp., <i>B. papayensis</i> e <i>B. yothersi</i> ..	68
Figura 29: Gel de agarose a 1% evidenciando a amplificação do genoma completo de HGSV2 em <i>A. thaliana</i> (At_11) proveniente de experimento de transmissão mediado por <i>B. papayensis</i> por RT-PCR..	69
Figura 30: Micrografias de análises de microscopia eletrônica de transmissão de tecido foliar da <i>A. thaliana</i> infectadas com HGSV2 através de um experimento de transmissão com ácaros <i>Brevipalpus</i> .	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de amostras de <i>Citrus</i> spp. com sintomas cloróticos analisadas neste trabalho.	35
Tabela 2: Lista dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-PCR	40
Tabela 3: Lista de amostras de <i>Citrus</i> spp. selecionadas para sequenciamento de alto rendimento (HTS) e seus respectivos métodos de extração.	42
Tabela 4: Iniciadores desenhados neste trabalho para a amplificação e o ressequenciamento Sanger do genoma completo de HGSV2.	45
Tabela 5: Lista de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas para o experimento de transmissão com ácaros <i>Brevipalpus</i> spp. das fontes de inóculo de HGSV2.	48
Tabela 6: Lista de plantas de <i>A. thaliana</i> utilizadas para os experimentos de transmissão realizados com ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> e <i>B. papayensis</i> .	49
Tabela 7: Identidade de nucleotídeos entre o isolado HGSV2 DMs_01 e membros aceitos e tentativos da família <i>Kitaviridae</i> .	54
Tabela 8: Quantidade e tamanho de contigs obtidos no sequenciamento de alto rendimento (HTS) do HGSV2.	62
Tabela 9: Comparação de identidade de nucleotídeos (nt) entre o isolado HGSV2_DM_s_01 e outros isolados obtidos neste trabalho, DMs_02, CdA_01 e Itn_02.	62
Tabela 10: Ensaios de transmissão do HGSV2 por ácaros <i>Brevipalpus</i> para plantas de <i>A. thaliana</i> , evidenciando a origem das fontes de inóculo e os resultados obtidos após RT-PCR.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA - Bahia

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

CTAB - *Cetyl trimethyl ammonium bromide* (Brometo de cetiltrimetilamônio)

CZ – Cloroze zonada

DEPC - Piracarbonato de dietil

ES – Espírito Santo

HTS - *High-throughput sequencing* (sequenciamento de alto rendimento)

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

LC – Leprose dos citros

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mRNA – RNA mensageiro

ORF – *Open reading frame* (fase de leitura aberta)

PEG – Polietileno glicol

pb – Pares de base

SC – Santa Catarina

siRNA – RNA de pequeno tamanho

SP – São Paulo

Ta – Temperatura de anelamento

TAE - Ácido-tris-acetato-etilenodiaminotetracético

Tm – Temperatura de *melting*

VTBs – Vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus*

VTB-C – VTB do tipo citoplasmático

VTB-N - VTB do tipo nuclear

RPM – Rotações por minuto

VLP – *Virus-like particles* (partículas semelhantes a vírus)

LISTA DE ACRÔNIMOS

BNRBV - blueberry necrotic ring blotch virus

CiCSV – citrus chlorotic spot virus

CiLV-C – citrus leprosis virus C

CiLV-C2 – citrus leprosis virus C2

CiLV-N – citrus leprosis virus N

CiCSV – clerodendrum chlorotic spot virus

CoRSV – coffee ringspot virus

HGSV – hibiscus green spot virus

HGSV2 – hibiscus green spot virus 2

HYBV – hibiscus yellow blotch virus

LigCSV- ligustrum chlorotic spot virus

LigLV - ligustrum leprosis virus

OFV – orchid fleck virus

PfGSV – passion fruit green spot virus

PisVX – pistachio virus X

PisVY – pistachio virus Y

SvRSV – Solanum violifolium ringspot virus

TPNRBV - tea plant necrotic ring blotch virus

ToFBV - tomato fruit blotch virus

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE ACRÔNIMOS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 A citricultura brasileira.....	16
3.2 Clorose zonada dos citros.....	18
3.3 Leprose dos citros.....	20
3.4 Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i>	21
3.5 Vírus da família <i>Kitaviridae</i>	24
3.6 Ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i>	30
3.7 Sequenciamento de alto rendimento (HTS)	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material Vegetal.....	33
4.2 Organograma geral do trabalho experimental	36
4.3 Criação de ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i>	38
4.4 Detecção de VTBs presentes no Brasil mediante RT-PCR.....	39
4.5 Detecção de VTBs mediante microscopia eletrônica de transmissão	40
4.6 Sequenciamento de alto rendimento (HTS) e identificação de possíveis VTBs	41
4.6.1 Sequenciamento de mRNA usando a plataforma Illumina	41
4.6.2 Estabelecimento de um protocolo de extração de RNA de pequeno tamanho e sequenciamento pela plataforma Ion Torrent.....	41
4.7 Montagem de genomas virais e anotação genômica	43
4.8 Desenvolvimento de iniciadores para detecção e validação do genoma completo de HGSV2 em amostras coletadas no Brasil	44
4.9 Análises filogenéticas.....	46
4.10 Identificação morfoanatômica de <i>Brevipalpus</i> e transmissão experimental de isolados brasileiros do HGSV2 a plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
4.11 Transmissão experimental de isolados brasileiros do HGSV2 por ácaros <i>Brevipalpus papayensis</i> e <i>B. yothersi</i> para plantas de <i>A. thaliana</i>	48
5. RESULTADOS.....	50

5.1	Manchas cloróticas em folhas e frutos de citros representam três subtipos de sintomas	50
5.2	RT-PCR com iniciadores degenerados indicam a presença de kitavírus nas amostras do Espírito Santo e da Bahia	51
5.3	MET sugere a presença de vírions em amostras de citros com sintomas de CZ.....	52
5.4	O kitavírus HGSV2 está presente em <i>Citrus</i> spp. no Brasil.....	53
5.4.1	O isolado DMs_01 de HGSV2 apresenta elevada identidade nucleotídica com o isolado HAI_1-1 do Havai	53
5.4.2	A organização gênica do RNA3 de HGSV2 do isolado DMs_01 é diferente da do isolado do Havai.....	56
5.4.3	HGSV2 está presente em pelo menos três estados das regiões Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil.....	58
5.4.4	Caracterização de outros isolados do HGSV2 no Brasil	60
5.4.5	A organização do RNA3 do HGSV2 em todos os isolados brasileiros é idêntica	64
5.5	Ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> e <i>B. papayensis</i> transmitem o HGSV2.....	65
5.6	Análises de microscopia eletrônica de transmissão demonstram alterações citopáticas nos tecidos de <i>A. thaliana</i> infectadas com HGSV2.....	69
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÕES.....	78
8	REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja doce (*Citrus x sinensis* (L.) Osbeck). Na safra de 2021/2022 foram produzidas 10.729.176 toneladas de laranja no cinturão citrícola dos estados de São Paulo e Minas Gerais (FUNDECITROS, 2022a). Além de laranja, outras espécies de citros são cultivadas no país, como a tangerina (*C. reticulata* Blanco) e a lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tanaka), com produção de 1.085.048 e 1.499.714 toneladas em 2020, respectivamente (IBGE, 2021). Pragas e patógenos são fatores limitantes da produtividade da citricultura brasileira. Na safra de laranja de 2021/2022 foram perdidas o equivalente a 21% do total de caixas de frutos produzidas por queda prematura de laranjas, sendo que a leprose dos citros (LC) foi responsável por 2% dessas perdas (FUNDECITROS, 2022a). Em adição à perda de frutos, nos pomares brasileiros o manejo da LC implica gastos anuais de cerca de US\$ 54 milhões, que se destinam ao controle do agente vetor da doença (BASSANEZI et al., 2019).

A LC é uma doença causada por vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs). Esse grupo de vírus apresenta partículas baciliformes e induzem lesões localizadas cloróticas e/ou necróticas em frutos, folhas e ramos, principalmente em plantas do gênero *Citrus* spp. (família Rutacea). Em condições naturais, os VTBs não infectam sistemicamente seus hospedeiros (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Filogeneticamente, os VTBs são classificados em dois gêneros: *Dichorhavirus* [ss(-)RNA], família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales* e *Cilevirus* [ss(+)RNA], família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales*. Os vírus do gênero *Higrevirus* [ss(+)RNA] pertencem à família *Kitaviridae*, mas não são considerados VTBs, pois não se conhece, com certeza, se a transmissão é mediada por ácaros do gênero *Brevipalpus* (KOONIN et al., 2020; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021). Os VTBs são causadores de diversas doenças em citros, café, maracujá e plantas ornamentais (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003).

No Brasil, a LC é causada prevalentemente pelo cilevírus citrus leprosis virus C (CiLV-C) (CHABI-JESUS et al., 2021). Em casos isolados e fora das zonas produtoras de citros, a LC também é produzida pela infecção dos dichorhavirus citrus leprosis virus N (CiLV-N) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017) e citrus chlorotic spot virus (CiCSV) (CHABI-JESUS et al., 2018). Na Colômbia, além do CiLV-C, a LC é causada pelo cilevírus citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2013) e pelo dichorhavirus orchid fleck virus (OFV-citros) (ROY et al., 2014). O OFV-citros também ocorre em

citros no México (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014), na África do Sul (COOK et al., 2019) e no estado do Havaí, EUA (OLMEDO-VELARDE et al., 2021).

Atualmente, a LC é a mais relevante entre as doenças virais que atingem a citricultura brasileira (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). A doença foi relatada inicialmente no Brasil em 1931 (BITANCOURT, 1934a), na mesma década que outra doença conhecida como clorose zonada dos citros (CZ) foi descrita no país (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a). A CZ apresenta sintomas cloróticos, com ausência ou pouca presença de necrose, e podem ser semelhantes aos da LC. A CZ tem possível etiologia viral, mas o agente causal ainda não foi identificado (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a). Com base em experimentos realizados na década de 1960 foi confirmada a transmissão do agente causal por ácaros do gênero *Brevipalpus* (ROSSETTI et al., 1965b, 1965a). Exemplares de amostras cítricas do período de 1933 a 1969 com sintomas de CZ estão conservadas no herbário do Instituto Biológico de São Paulo (BITANCOURT, 1934a). Em 2013, sintomas semelhantes aos de CZ e LC em plantas de limão volkameriano (*C. volkameriana*) e *Hibiscus arnottianus* foram descritos no Havaí, EUA. As análises das plantas determinou a presença do higravírus hibiscus green spot virus 2 (HGSV2) (MELZER et al., 2013a).

Entre os anos de 2016 e 2022, amostras de *Citrus* spp. exibindo sintomas cloróticos e ausência de necrose foram enviadas à Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada (ULR-BMA), no Instituto Biológico (IB-SP) em São Paulo, SP, por pequenos produtores do Espírito Santo (ES), pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Mandioca e Fruticultura de Cruz das Almas, Bahia (BA) e da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), Santa Catarina (SC). As análises dessas amostras por RT-PCR com iniciadores específicos para os vírus que produzem a LC nas Américas (CiLV-C, CiCSV, CiLV-N, CiLV-C2 e OFV-citros) não revelaram a presença de VTBs. No entanto, nos ensaios de RT-PCR com iniciadores degenerados para detectar membros da família *Kitaviridae* (MELZER et al., não publicado) foram obtidos *amplicons* do tamanho esperado.

Baseado nos resultados moleculares preliminares, hipotetizou-se que os sintomas observados nas amostras cítricas dos estados ES, BA e SC são induzidos por um kitavírus que é o agente causal da CZ. Portanto, decidiu-se caracterizar o agente causal não apenas

das amostras sintomáticas de campo recentemente coletadas, mas também o da clorose zonada dos citros mantidas no acervo do herbário do Instituto Biológico.

O estudo possibilitou a identificação do agente causal da clorose zonada dos citros em amostras herborizadas entre as décadas de 1930 e 1960. O mesmo agente causal da CZ foi responsável pelos sintomas cloróticos de citros em amostras coletadas em três estados brasileiros entre os anos de 2016 e 2022. Também foi possível constatar a transmissão do agente causal por ácaros do gênero *Brevipalpus*.

2 OBJETIVOS

Identificar e caracterizar molecular e biologicamente o agente causal de sintomas cloróticos semelhantes à leprose dos citros que afetam plantas cítricas no Brasil.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Identificar e caracterizar o agente causal dos sintomas cloróticos em plantas cítricas coletadas nos estados da Bahia e do Espírito Santo, através de sequenciamento de alto rendimento (HTS);
- 2) Identificar o agente causal presente em amostras de citros com sintomas de clorose zonada provenientes do estado de São Paulo (1933-1965), conservadas no herbário do IB, através de HTS;
- 3) Transmitir experimentalmente o agente causal de manchas cloróticas em citros com ácaros do gênero *Brevipalpus* para plantas de *Arabidopsis thaliana*;
- 4) Desenvolver iniciadores específicos do genoma completo do agente causal identificado e validá-los em ensaios de RT-PCR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A citricultura brasileira

A citricultura está presente em 350 dos 5568 municípios brasileiros, gerando 200 mil empregos diretos e indiretos e movimentando US\$ 14 bilhões por ano (NEVES; TROMBIN, 2017). O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com 16 milhões de toneladas produzidas em 2021 (IBGE, 2021). A maior parte da fruta é produzida no cinturão citrícola, que compreende parte dos estados de São Paulo e Minas Gerais (CITRUSB, 2022), enquanto os estados da Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina produziram 594.184; 20.173 e 27.401 toneladas, respectivamente (IBGE, 2021) A exportação do suco de laranja concentrado e congelado entre 2021 e 2022 arrecadou mais de um bilhão de dólares, sendo que mais de 548 mil toneladas foram exportadas

principalmente para a Europa (65%), os EUA (21%), o Japão (5%) e a China (4%) (CITRUSBR, 2022).

A citricultura brasileira foi responsável por produzir um milhão de toneladas de lima ácida Tahiti em 2021, os estados da Bahia, Espírito Santo e Santa Catarina produziram 72.276; 19.768 e 403 toneladas, respectivamente (IBGE, 2021)). O estado de São Paulo, com 98% das exportações dessa fruta, foi o principal produtor em 2019, seguidos pelos estados de Minas Gerais e Bahia (FRUTA, 2021). A lima ácida Tahiti é a terceira fruta mais exportada em faturamento no Brasil, principalmente para a União Europeia, o que gerou 100 milhões de dólares em 2019 (FRUTA, 2021). Além de laranja e lima ácida, a citricultura brasileira produziu um milhão de toneladas de tangerina (*C. reticulata*) em 2021, os estados da Bahia e do Espírito Santo foram responsáveis por produzir 17.774 e 30.332 toneladas, respectivamente, enquanto os estados de São Paulo e de Minas Gerais lideram a produção com mais de 244 mil toneladas (IBGE, 2021). A produção no estado do Paraná tem destaque na região do Vale do Ribeira, com 90% proveniente de agricultura familiar (NASCIMENTO; EVANGELISTA; NASCIMENTO, 2020).

O HLB/*Greening* (*huanglongbing*) é a principal doença em pomares de citros do mundo (NEVES et al., 2020). No Brasil os citros são acometidos também por outras doenças bacterianas como o cancro cítrico e a clorose variegada dos citros (CVC); de origem fúngicas como a pinta preta dos citros e a podridão floral dos citros (PFC); e virais como a tristeza, a leprose dos citros (LC) e a morte súbita dos citros (MSC) (EMBRAPA, 2022; SILVA JUNIOR et al., 2022). Além disso, a citricultura também é afetada por pragas, como o ácaro da falsa ferrugem e o branco, mosca-das-frutas, psilídeos e bicho-furão (EMBRAPA, 2022; SILVA JUNIOR et al., 2022).

Entre as doenças virais, a tristeza dos citros tem um papel relevante e histórico para a citricultura brasileira (MATTOS JUNIOR et al., 2005), enquanto a LC é a que causa maior impacto econômico no país atualmente (BASTIANEL et al., 2010; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018a). Além destas, a clorose zonada (CZ) é uma doença de possível etiologia viral, mas sem agente causal conhecido (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a; ROSSETTI et al., 1965b, 1965a; ROSSETTI; LASCA; NEGRETTI, 1969).

3.2 Clorose zonada dos citros

A clorose zonada dos citros (CZ) é uma doença descrita pela primeira vez em 1933, no Rio de Janeiro, afetando laranjeiras doces (*C. sinensis*) das variedades Pera e Lima, e em limoeiro Cravo (*C. limonia*). Um agente viral desconhecido foi apontado como possível responsável por causar a doença (BITANCOURT; GRILLO, 1934a). No mesmo ano, a doença foi relatada em pomares de diferentes cultivares de citros do interior e litoral de São Paulo (BITANCOURT, 1934b).

O nome ‘clorose zonada’ deriva da sintomatologia da doença, que causa principalmente lesões cloróticas e/ou necróticas circulares/concêntricas ou irregulares em folhas e frutos e raramente em galhos (Figura 1) (BITANCOURT; GRILLO, 1934a). Esses sintomas mantêm alguns padrões semelhantes com os da leprose dos citros, as das manchas com anéis concêntricos (do inglês ‘concentric ring blotch’) da África do Sul e da psorose (BITANCOURT, 1935a; BITANCOURT; GRILLO, 1934a). Na década de 1930, a presença da doença nos pomares cítricos foi associada à queda prematura de frutos e os sintomas comprometiam a exportação da fruta (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a). A partir da década de 1960, os relatos da CZ no Brasil eram restritos a regiões litorâneas (ROSSETTI et al., 1965; TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 1988).

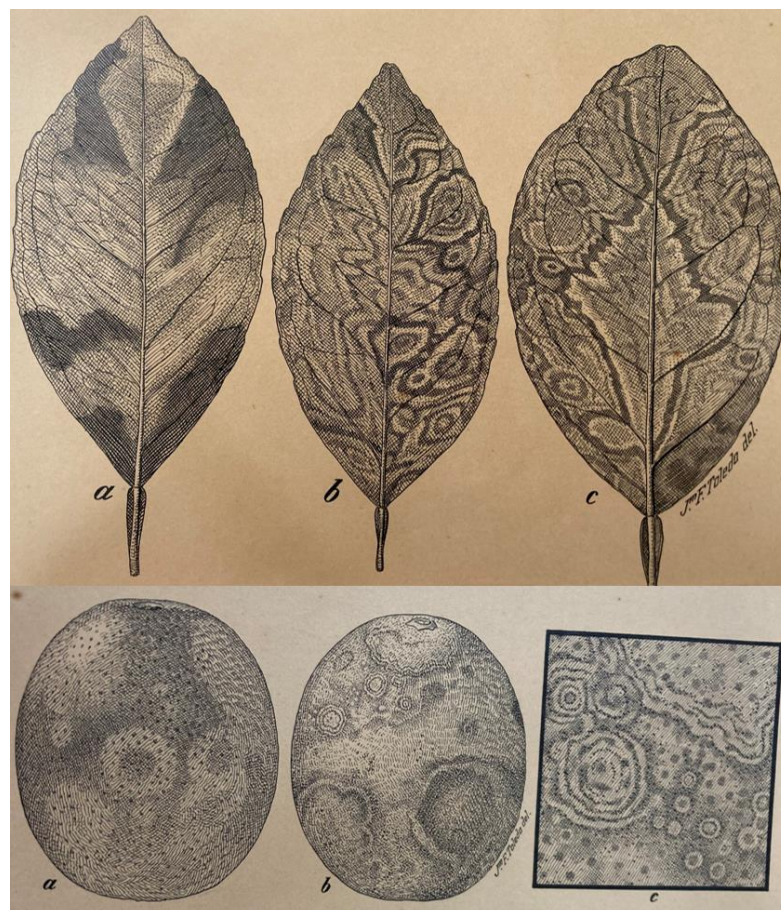


Figura 1: Ilustrações científicas de folhas e frutos de *Citrus* sp. com sintomas de clorose zonada dos citros, realizadas por Joaquim Franco de Toledo na década de 1930. Ilustrações disponíveis no acervo do Centro de Memória do Instituto Biológico de São Paulo.

A transmissão vetorial do agente causal da CZ a plantas de *Citrus* spp. foi estudada em experimentos com diversas espécies de ácaros e insetos. Apenas as plantas infestadas com ácaros *Brevipalpus phoenicis* (sensu lato) manifestaram sintomas de 22 a 25 dias após infestação (ROSSETTI et al., 1965a, 1965b). Ressalta-se que *Brevipalpus phoenicis* era considerado uma única espécie (sensu stricto) até o ano de 2015, quando foi reclassificado em um complexo com sete espécies (sensu lato) (BEARD et al., 2015). Em outros experimentos, os ácaros *Brevipalpus* foram confinados em folhas sintomáticas de CZ e as plantas de *Citrus* spp. que receberam os inóculos manifestaram sintomas de 48 a 80 dias após a infestação (ROSSETTI; LASCA; NEGRETTI, 1969). Plantas saudáveis de *Citrus* spp. que foram encostadas em plantas com sintomas de CZ e pulverizadas com acaricidas apresentaram redução dos sintomas frente às tratadas com inseticidas (ROSSETTI et al., 1965a, 1965b).

Folhas com sintomas de CZ coletadas na primeira metade do século XX, assim como folhas das árvores utilizadas nos experimentos de transmissão com *Brevipalpus* nas

décadas de 1950-1960 foram devidamente conservadas e formam parte do acervo do herbário do Instituto Biológico de São Paulo.

3.3 Leprose dos citros

A leprose dos citros (LC) foi relatada pela primeira vez na Flórida, EUA, há mais de um século (FAWCETT, 1911). Desde a década de 1960 não há relatos da doença naquele estado, o que pode ser consequência de geadas nas regiões produtoras de citros, a mortes dos pomares, assim como o uso de enxofre para o controle do vetor (CHILDERS; RODRIGUES; RIVERA, 2001). No Brasil, a LC foi relatada desde 1931 no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1934a) e constitui uma doença endêmica que afeta significativamente a citricultura nacional (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Na década de 1960 foi descoberta a transmissão dos agentes causais da LC por ácaros do gênero *Brevipalpus* (KNORR, 1968). Atualmente, sabe-se que LC pode ser causada por pelo menos cinco espécies de vírus, transmitidas naturalmente e experimentalmente por cinco espécies de ácaros do gênero *Brevipalpus* (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). A LC induz lesões localizadas cloróticas e/ou necróticas em folhas, frutos e ramos de plantas de citros (Figura 2) (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). No Brasil o principal agente causal da LC é o citrus leprosis virus C (CiLV-C). A estirpe São José do Rio Preto (SJP) de CiLV-C é prevalente na principal região produtora de citros de São Paulo e Minas Gerais, enquanto a estirpe Cordeirópolis (CDR) é mais frequente em pomares não comerciais ou distantes do cinturão citrícola (CHABI-JESUS et al., 2021; TASSI, 2018). Membros da estirpe SJP possuem vantagens adaptativas em relação aos da estirpe CDR, pois atingem maior carga viral em plantas de citros (BARRO, 2022) e são transmitidos mais eficientemente por ácaros *B. yothersi* (TASSI et al., 2021). Uma terceira estirpe de CiLV-C, chamada Assunção (ASU), foi detectada apenas em folhas de citros conservadas no herbário do IB-SP, coletadas na década de 1930 no Paraguai (CHABI-JESUS et al., 2021). Além do CiLV-C, em pomares não comerciais, a LC no Brasil é causada pelos dichorhavirus citrus leprosis virus N (CiLV-N) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017) e citrus chlorotic spot virus (CiCSV) (CHABI-JESUS et al., 2018).

O CiLV-C está distribuído do México até a Argentina (BASTIANEL et al., 2010). Na Colômbia, além de CiLV-C, o cilevírus citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2013) e o dichorhavirus orchid fleck virus (OFV-citros) também causam a LC (ROY et al., 2014). O OFV-citros também ocorre no México, na África do Sul e no Havaí, EUA

(COOK et al., 2019; CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; OLMEDO-VELARDE et al., 2021).

O manejo da LC depende do monitoramento de ácaros *Brevipalpus* e sintomas da doença no campo. Para o controle, que requer maior investimento, depende-se quase que exclusivamente de acaricidas (BASSANEZI, 2019; FUNDECITROS, 2022b; SILVA JUNIOR et al., 2022). O uso de cercas vivas, quebra-ventos e de mudas sadias podem contribuir com a prevenção da doença, além das podas, eliminação de tecidos infectados e colheita antecipada dos frutos. O controle mediante o uso de acaricidas é realizado com aplicações preventivas programadas ou de acordo com a densidade populacional de 1 a 5% de ácaros presentes nos frutos (SILVA JUNIOR et al., 2022).

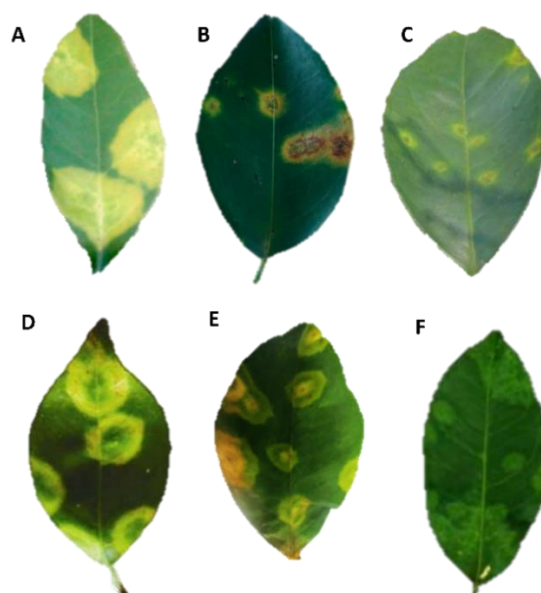


Figura 2: Folhas de *Citrus* spp. exibindo sintomas causados por VTBs e pelo kitavírus hibiscus green spot virus 2 (HGSV2). Lesões localizadas cloróticas e/ou necróticas causadas por: A: citrus chlorotic spot virus (CiCSV), B: citrus leprosis virus N (CiLV- N), C: citrus leprosis virus C (CiLV-C), D: citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2), E: orchid fleck virus (OFV) e F: hibiscus green spot virus 2 (HGSV2). Figuras retiradas de (BASTIANEL et al., 2010; MELZER et al., 2013a; ROY et al., 2013; CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018).

3.4 Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus*

Os vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTBs) induzem lesões cloróticas e/ou necróticas localizadas, nas folhas, frutos e ramos (Figura 2). Em condições naturais não infectam sistemicamente suas hospedeiras e se acumulam em grupos de células do

parênquima e na epiderme (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). A infecção sistêmica por VTBs foi descrita para o coffee ringspot virus (CoRSV) em plantas cultivadas a temperaturas elevadas como *Chenopodium quinoa* (BOARI et al., 2004; RAMALHO et al., 2014, 2016) e espinafre (*Tetragonia expansa*) (BOARI et al., 2004). Também o clerodendrum chlorotic spot virus (ClCSV) foi descrito causando infecção sistêmica em *C. amaranticolor* e *C. quinoa* (KITAJIMA et al., 2008).

Os VTBs induzem anomalias citológicas contrastantes nas células vegetais infectadas. Os VTBs do tipo nuclear (VTB-N) replicam-se no núcleo (Figura 3) enquanto os VTBs do tipo citoplasmático (VTB-C) replicam-se no citoplasma (Figura 3). Os VTBs-N apresentam genomas bissegmentados, de ssRNA de sentido negativo (-ssRNA), possuem ~ 6-7 kb por segmento, e pertencem ao gênero *Dichorhavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales* (DIETZGEN et al., 2018). Os VTBs-C também possuem genomas bissegmentados de ssRNA, mas de sentido positivo (+ssRNA), com ~9 kb no RNA1 e ~3,5-5 kb no RNA2. Eles pertencem ao gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales* (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). Os vírus do gênero *Dichorhavirus* são transmitidos por ácaros *Brevipalpus* de maneira persistente propagativa (DIETZGEN et al., 2018), enquanto a interação vírus-vetor para o CiLV-C do gênero *Cilevirus* é persistente, sem comprovação de replicação ou não no ácaro (TASSI et al., 2017, 2022).

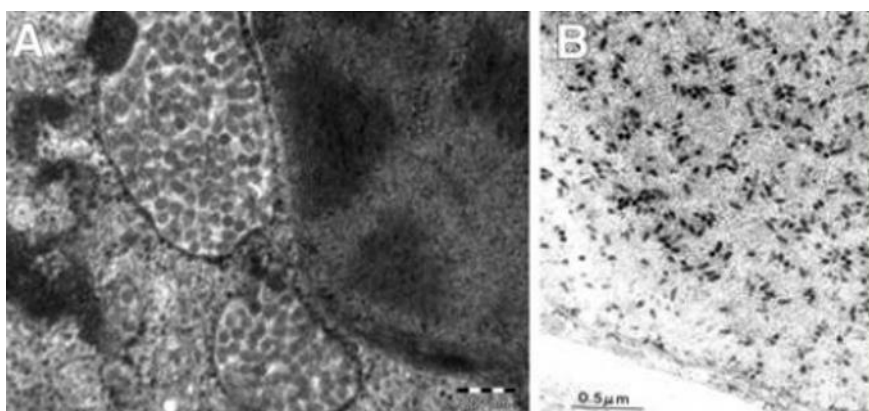


Figura 3: Figuras de microscopia eletrônica de transmissão com partículas de vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB). A: Micrografia de partículas de um VTB citoplasmático. B: Micrografia de partículas de um VTB nuclear. Fotos retiradas de (BASTIANEL et al., 2010).

No Brasil, o CiLV-C é prevalente nos pomares cítricos, com a presença das estirpes SJP e CDR, enquanto dois VTBs-N que também produzem a LC, o citrus leprosis

virus N (CiLV-N), restrito a quatro cidades do estado de São Paulo e o citrus chlorotic spot virus (CiCSV), relatado em uma cidade do estado do Piauí (CHABI-JESUS et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). Fora do Brasil, há relatos do VTB-C citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) infectando citros na Colômbia (ROY et al., 2013) e do VTB-N orchid fleck virus (OFV-citros) causando a LC no México, Colômbia, África do Sul e no Havaí, EUA (COOK et al., 2019; CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; OLMEDO-VELARDE et al., 2021; ROY et al., 2014).

O VTB-N coffee ringspot virus (CoRSV) (RAMALHO et al., 2014) e o VTB-C passion fruit green spot virus (PfGSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) afetam outras culturas de importância econômica no Brasil como a do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e a do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), respectivamente. O CiLV-C2 também afeta plantas de maracujá no Havaí, EUA (OLMEDO-VELARDE et al., 2022). O VTB-N clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018b) e os VTBs-C membros tentativos do gênero *Cilevirus*, *Solanum violifolium* ringspot virus (SvRSV), *Ligustrum chlorotic spot virus* (LigCSV) e *Ligustrum leprosis virus* (LigLV) afetam espécies de plantas ornamentais (FERREIRA et al., 2007; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022).

Dentre as plantas ornamentais, as do gênero *Hibiscus* se destacam por serem reservatórios de VTBs. Segundo as características morfométricas dos vírions e a morfopatologia das células infectadas, um VTB-C nomeado hibiscus green spot virus (HGSV), foi descrito no Brasil desde os anos 2000 (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003). Com a detecção molecular da infecção por PfGSV em hibisco de numerosas regiões do Brasil (COSTA-RODRIGUES et al., 2022) especula-se que o vírus previamente denominado HGSV seja realmente PfGSV, que infecta, além de plantas de maracujazeiro, ampla gama de hospedeiras ornamentais (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

Uma década após o relato de HGSV no Brasil (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003), o hibiscus green spot virus 2 (HGSV2) foi relatado no Havaí, EUA. O HGSV2 causa manchas verdes em hibiscos semelhantes às descritas no Brasil, e por isso a equivalência nominal (MELZER et al., 2013a). Em citros, o HGSV2 produz manchas cloróticas circulares com características comuns àquelas associadas à leprose e à clorose zonada dos citros. Devido às características peculiares do genoma do HGSV2, o vírus foi designado ao gênero *Higrevirus*, da família *Kitaviridae*. Embora não se

conheça o vetor de HGSV2, acredita-se que ácaros do gênero *Brevipalpus* possam estar envolvidos na sua transmissão (MELZER et al., 2013a; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021).

Além do CiLV-C2, o também VTB-C hibiscus yellow blotch virus (HYBV) afeta plantas de hibiscos no Havaí, EUA (MELZER et al., 2013b; OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021). O CiLV-C2 ainda infecta hibiscos na Flórida, EUA (ROY et al., 2018). No Brasil, os VTBs-N citrus chlorotic spot virus (CHABI-JESUS et al., 2018) e clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018b) infectam árvores de hibisco da praia (*Hibiscus tiliaceus* sin. cient. *Talipariti tiliaceum* (L.) Fryxell) e arbustos de hibisco (*Hibiscus sinensis*), respectivamente. No entanto, devido ao impacto econômico, a LC é a doença mais estudada dentre aquelas causadas por VTBs (BASSANEZI et al., 2019; DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

3.5 Vírus da família *Kitaviridae*

A família *Kitaviridae* foi criada em 2018 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). A família reúne vírus de RNA de fita simples e sentido positivo, com partículas baciliformes ou quase simétricas que previamente haviam sido agrupados nos gêneros *Blunervirus*, *Cilevirus* e *Higrevirus* (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021). O nome da família presta homenagem ao virologista e microscopista brasileiro Dr. Elliot Watanabe Kitajima (QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021).

Os vírus da família *Kitaviridae* causam lesões localizadas cloróticas e/ou necróticas nas hospedeiras vegetais (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021) com exceção do tea plant ring blotch virus (TPNRBV), do gênero *Blunervirus*, o qual aparentemente causa infecção sistêmica em seus hospedeiros (HAO et al., 2018). Os três membros do gênero *Blunervirus*, blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV) (QUITO-AVILA et al., 2013), tea plant necrotic ring blotch virus (TPNRBV) (HAO et al., 2018) e tomato fruit blotch virus (ToFBV) (CIUFFO et al., 2020), possuem genomas divididos em quatro moléculas de +ssRNA (Figura 4) e presença de cauda poli A, com exceção do BNRBV (QUITO-AVILA et al., 2013). O RNA1 apresenta apenas uma ORF que codifica uma proteína com domínios metiltransferase (MTR) e helicase (HEL). O RNA2 possui uma ORF que codifica uma

proteína putativa RdRp com domínio HEL, e o RNA3 possui cinco ORFs pequenas que codificam proteínas desconhecidas, uma delas, a P22, é homóloga à P23 do higrevírus e à P24 dos cilevírus. O RNA4 possui uma ORF que codifica a proteína de movimento (MP), a qual possui os motivos característicos da família 3A (QUITO-AVILA et al., 2013; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021).

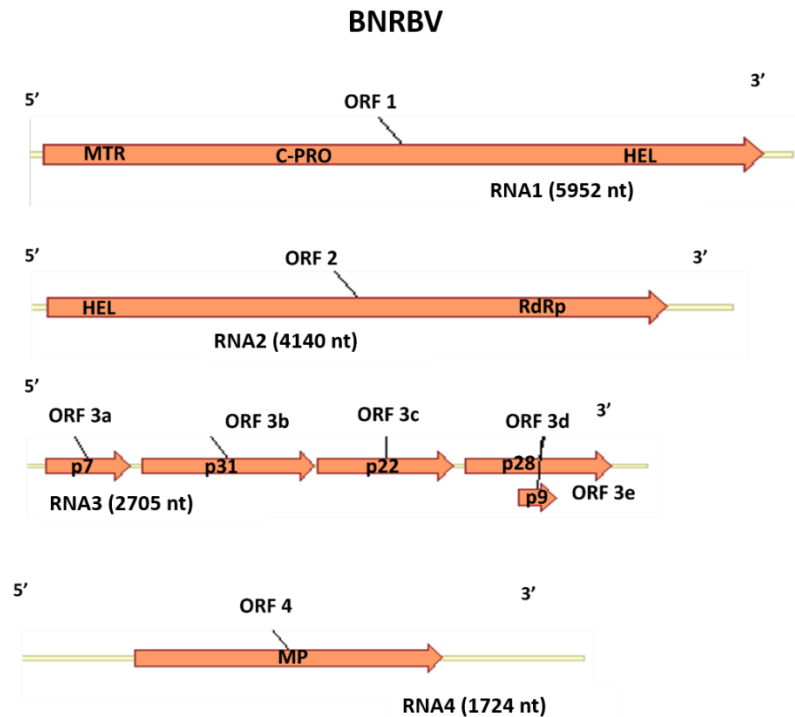


Figura 4: Organização genômica do blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), gênero *Blunervirus*. Genoma dividido em quatro RNAs e oito ORFs. Figura gerada no Vector NTI.

Em folhas de tomate cultivados na Itália com sintomas causados pelo blunervírus ToFBV não foi possível a visualização de partículas virais em análises de microscopia eletrônica de transmissão (CIUFFO et al., 2020). O ToFBV foi recentemente relatado infectando tomates no Brasil (NAKASU; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2022) e foi possível a observação de partículas virais de ~25 nm x 100 nm (Figura 5) (KITAJIMA et al., 2022). Em folhas infectadas com o TPNRBV foram visualizadas partículas com ca. 80-100 nm no citoplasma de células infectadas (Figura 6) (HAO et al., 2018).

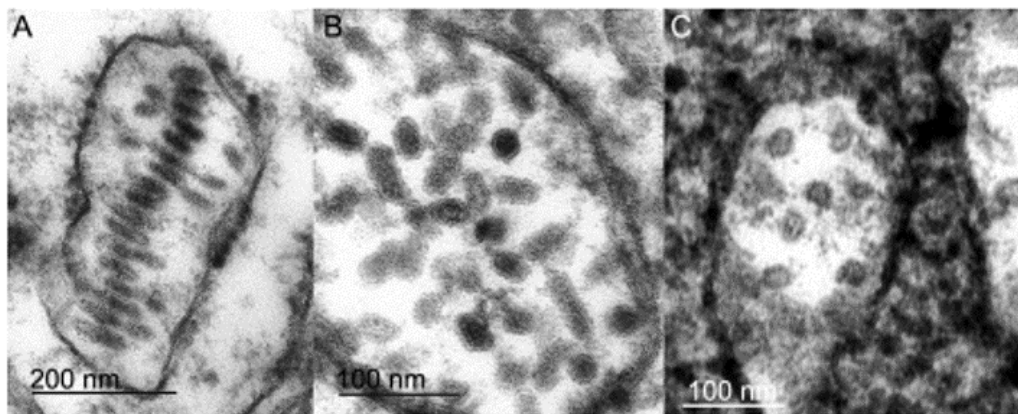


Figura 5: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de células de pericarpo de tomate infectadas com ToFBV indicando as partículas virais. A e C: Amostra de tomateiro cv. Giacomo. B: Amostra de tomateiro cv. Grazianni. Figura retirada de (KITAJIMA et al., 2022).

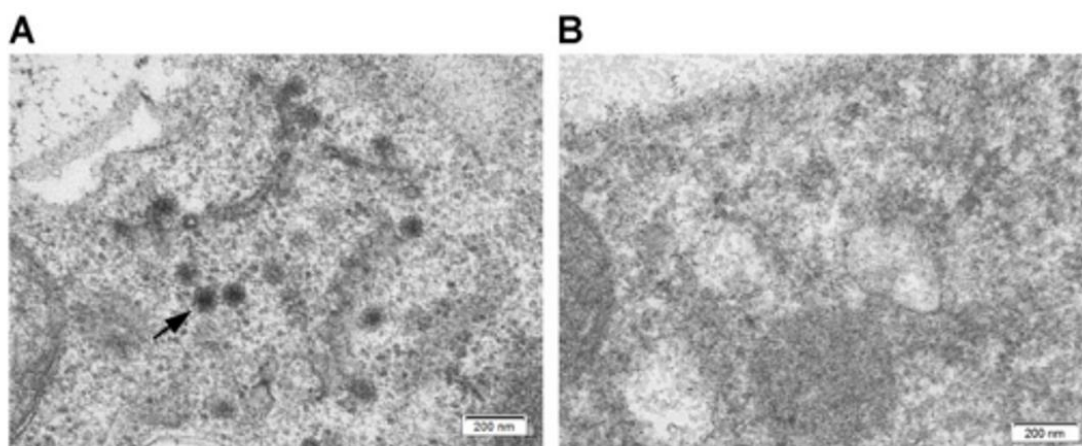


Figura 6: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de (A) seções ultrafinas de folhas de *Camellia sinensis* infectadas com o tea plant ring blotch virus (TPNRBV) e (B) folhas não infectadas. A seta indica possíveis partículas virais de aproximadamente 85 nm do TPNRBV. Escala de 200 nm. Figura retirada de (HAO et al., 2018).

O gênero *Cilevirus* inclui quatro membros aceitos: citrus leprosis virus C (CiLV-C) (LOCALI-FABRIS et al., 2006), citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2013), passion fruit green spot virus (PFGSV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) e hibiscus yellow blotch virus (HYBV) (OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021). Além deles, existem três membros tentativos denominados *Solanum violifolium* ringspot virus (SvRSV), *Ligustrum chlorotic spot virus* (LigCSV) e *Ligustrum leprosis virus* (LigLV) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). O genoma padrão dos cilevírus compreende dois RNAs poliadenilados (Figura 7). O RNA1 apresenta duas ORFs que codificam a poliproteína RdRp com domínios MTR, HEL e RdRp e uma menor que codifica a possível proteína do capsídeo, P29 (Figura 7) (LEASTRO et al., 2018; LOCALI-FABRIS et al., 2006). A ORF *p29* não tem homólogos em outros membros da

família *Kitaviridae* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021).

O RNA2 dos cilevírus aceitos no gênero e encontrados na América do Sul apresenta quatro ORFs. A ORF1 codifica uma proteína P15 com função desconhecida e sem semelhança com outras proteínas (PASCON et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2021). A ORF2 codifica uma possível glicoproteína P61, que apresenta domínios transmembranas e peptídeos sinais (KUCHIBHATLA et al., 2014). A P61 se acumula no retículo endoplasmático (LEASTRO et al., 2018) e é considerada um efector viral que quando expressada ectopicamente em plantas ocasiona sintomas semelhantes à resposta de hipersensibilidade e morte celular (ARENA et al., 2020). A ORF3 codifica a proteína de movimento P32 (MP) com motivos conservados da superfamília 30K, e participa no transporte viral (LEASTRO et al., 2021; PASCON et al., 2006). A ORF4 codifica a P24, uma possível proteína de membrana que exhibe o domínio conservado SP24 presente em outros kitavírus e em um grupo crescente de vírus de artrópodes, entre eles os negevírus (grupos nelorpivirus e sandewavirus) (VASILAKIS et al., 2013; KUCHIBHATLA et al., 2014; KONDO et al., 2020).

Alguns cilevírus apresentam uma região intergênica entre as ORFs *p15* e *p61*, na que estão presentes pequenas ORFs, como a *p7* no CiLV-C2 e *p11* e *p13* em PfGSV (QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020, 2021). Os cilevírus tentativos SvRSV, LigCSV e LigLV e o aceito HYBV apresentam genomas um pouco distintos dos cilevírus padrão, pois não apresentam a *p15* e a região intergênica com pequenas ORFs; no entanto, podem apresentar pequenas ORFs sobrepostas no genoma (OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). A possível proteína do capsídeo de HYBV, a P33, é codificada pela ORF4 do RNA2, enquanto a P29 dos outros cilevírus aceitos é codificada pela ORF2 do RNA1 (OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021).

Os membros do gênero *Cilevirus* possuem partículas curtas (~40-50 x 60-120 nm) (Figura 3) presentes no citoplasma e no viroplasma vacuolado eletrodense das células vegetais infectadas (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2021).

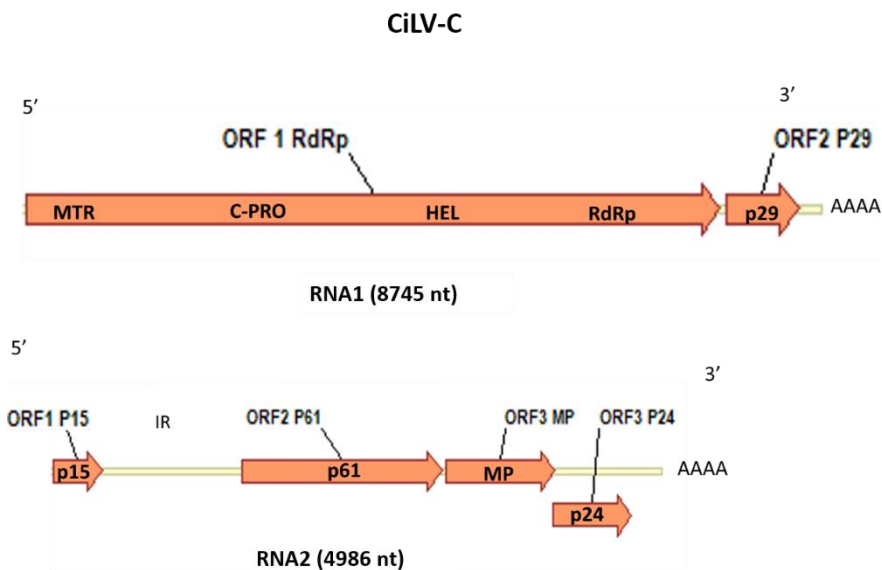


Figura 7: Organização genômica do citrus leprosis virus C (CiLV-C), gênero *Cilevirus*. Genoma dividido em dois segmentos de RNA com seis ORFs. Figura gerada no Vector NTI.

O gênero *Higrevirus* é composto por apenas um membro, o hibiscus green spot virus 2 (HGSV2), que possui o genoma dividido em três segmentos de +ssRNA poliadenilados (Figura 8) (MELZER et al., 2013a). O RNA1 apresenta duas ORFs: a *RdRp*, que codifica uma possível proteína associada à replicação (MELZER et al., 2013a), e a ORF *p10* que codifica a proteína P10, de função desconhecida, homóloga à P10 de HYBV (OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021). O RNA2 possui quatro ORFs. A proteína P50, codificada pela ORF *p50* é de função desconhecida (MELZER et al., 2013a), enquanto as P39 e P9, codificadas pelas ORFs 2 e 3 compõe o *binary movement block* (BMB) e mediam o movimento viral célula a célula, e a P6, codificada pela ORF4 demonstrou não ser essencial ao movimento viral (LAZAREVA et al., 2017). O RNA3 possui três ORFs que codificam as proteínas P33 e P29, ambas com funções desconhecidas, enquanto a P23 é homóloga da P24 codificada no RNA2 dos cilevírus (MELZER et al., 2013; MOROZOV; SOLOVYEV, 2015).

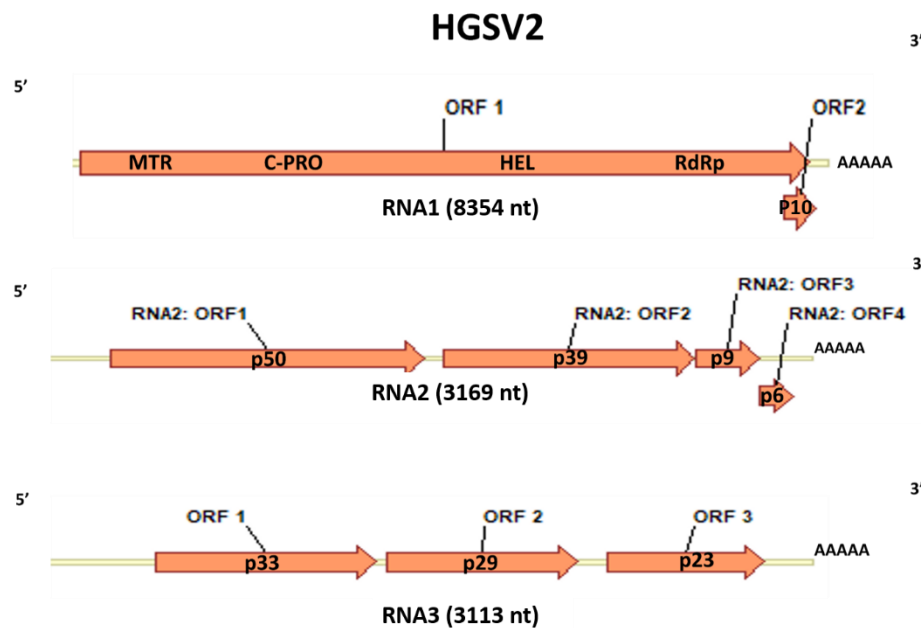


Figura 8: Organização genômica do hibiscus green spot virus 2 (HGSV2), gênero *Higrevirus*. Genoma dividido em três moléculas de RNA com nove ORFs. Figura gerada pelo Vector NTI.

Nas plantas com HGSV2, encontram-se agregados de partículas baciliformes curtas (~30 x 50 nm) semelhantes a vírus (*virus-like particles*, VLPs) no citoplasma de células infectadas (Figura 9). As VLPs são pouco abundantes nos tecidos sintomáticos e não se encontram nos tecidos assintomáticos (MELZER et al., 2013a).

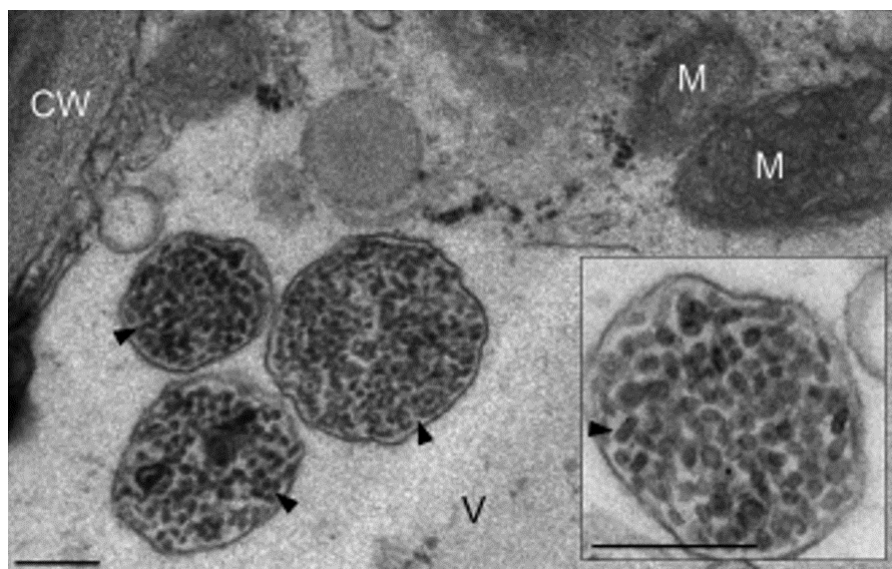


Figura 9: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de células de tecidos foliares de *C. volkameriana* infectadas com hibiscus green spot virus 2 (HGSV2). Setas indicam agregados contendo partículas baciliformes curtas semelhantes a vírus (VLPs) com tamanho ca. 30-50 nm. CW: Parede celular. M: Mitocôndria. V: Vacúolo. Escala de 250 nm. Figura retirada de (MELZER et al., 2013a).

3.6 Ácaros do gênero *Brevipalpus*

Os ácaros do gênero *Brevipalpus* Donnadieu pertencem à família *Tenuipalpidae* e são agrupados em mais de 280 espécies presentes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (MESA et al., 2009). Esses ácaros são fitófagos e aproximadamente uma dezena de espécies destacam-se por serem vetores de cilevírus e/ou dichorhavírus (DE LILLO et al., 2021). Ácaros de algumas espécies do gênero *Brevipalpus*, incluindo as principais espécies vetores, se reproduzem por partenogênese telítoca, ou seja, ovos não fecundados dão origem a fêmeas num processo que depende da presença de uma bactéria endossimbionte do gênero *Cardinium*. Ácaros machos dificilmente são encontrados no campo (WEEKS; MAREC; BREEUWER, 2001; CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN, 2003; KITAJIMA; RODRIGUES; FREITAS-ASTUA, 2010).

A principal espécie vetora da LC no Brasil é a *B. yothersi* Baker (Figura 10). Ácaros dessa espécie transmitem CiLV-C, CiLV-C2, possivelmente o CiCSV, e experimentalmente o SvRSV (FERREIRA et al., 2007; ROY et al., 2013; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; ARENA et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018). O CiCSV possivelmente é transmitido também pelo *B. aff. yothersi* (CHABI-JESUS et al., 2018).

O *B. californicus* é aparentemente o único vetor de OFV-citros (GARCÍA-ESCAMILLA et al., 2018), enquanto *B. phoenicis* é o vetor de CiLV-N (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). O *B. papayensis* transmite o CiLV-C em condições experimentais (NUNES et al., 2018) e o CoRSV naturalmente (NUNES et al., 2018). O *B. papayensis* também transmite o LigCSV e o *B. obovatus* o SvRSV (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022).

O ácaro *Brevipalpus phoenicis* sensu lato foi considerado o responsável por transmitir o agente causal da clorose zonada dos citros (ROSSETTI et al., 1965a, 1965b). No entanto, em 2015 os critérios de classificação da espécie foram reavaliados, e o “grupo *phoenicis*” foi desmembrado em sete espécies (BEARD et al., 2015), entre elas *B. yothersi* e *B. papayensis*, as quais são encontradas em pomares de citros no Brasil (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015) e são vetoras do CiLV-C (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; NUNES et al., 2018). Além do *B. phoenicis* s.l. outra espécie de ácaro foi identificada em pomares com CZ, o *B. obovatus* (ROSSETTI; LASCA; NEGRETTI, 1969).

As espécies do complexo ‘*Brevipalpus phoenicis*’ s.l. são diferenciadas morfoanatomicamente por micropilacras nas cutículas do dorso e do ventre dos ácaros e o

formato da vesícula da espermateca (BEARD et al., 2015). Além da identificação morfológica, iniciadores descritos do gene citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial podem ser utilizados para diferenciação de espécies de *Brevipalpus* (FOLMER et al., 1994; NAVAJAS et al., 1998; TASSI, 2018).



Figura 10: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do ácaro *Brevipalpus yothersi*. Escala 50 μm . Figura retirada de (TASSI et al., 2017).

3.7 Sequenciamento de alto rendimento (HTS)

As tecnologias de sequenciamento de alto rendimento “*High-throughput sequencing*” (HTS) permitem que milhares de fragmentos de DNA ou RNA sejam sequenciados de uma única vez sem conhecimento prévio da sequência presente nas amostras (GU; MILLER; CHIU, 2019).

O sequenciamento de alto rendimento é amplamente utilizado para identificação e caracterização de fitovírus e as plataformas mais utilizadas são Illumina e Ion Torrent (GU; MILLER; CHIU, 2019). A Illumina (San Diego, CA, EUA) possui uma variedade de sistemas (iSeq, MiSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq e NovaSeq), a sua estratégia de amplificação é por síntese e leitura ótica de nucleotídeos marcados com fluorescência que determinam a identidade do nucleotídeo (A, G, T ou C) (GU; MILLER; CHIU, 2019). A plataforma de sequenciamento Ion Torrent, oferecida pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), é um tipo de sequenciamento em semicondutores de íons que detectam alterações no pH conforme a amplificação e incorporação das bases (GU; MILLER; CHIU, 2019).

No HTS de fitovírus podem ser utilizadas diferentes estratégias de acordo com as características inerentes ao genoma viral alvo e a amostra de onde ele vai ser extraído.

Para fitovírus de RNA, as estratégias mais utilizadas são de RNA total, mRNA, RNA fita dupla e RNA de pequeno tamanho (siRNA) (BESTER et al., 2021).

O sequenciamento de alguns vírus responsáveis por causar a LC tem sido feito através da tecnologia Illumina. O CiLV-N e o CiCSV foram sequenciados após o isolamento da fração de mRNA (CHABI-JESUS et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). No caso do isolado SJP de CiLV-C, o genoma viral foi obtido a partir da fração de siRNA (RNAs de pequeno tamanho, entre 21 e 25 nucleotídeos que são produtos do mecanismo de silenciamento gênico) (sRNA, miRNA ou siRNA) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; PANTALEO; MASUTA; SHIMURA, 2021), mesma metodologia seguida para o sequenciamento de CiLV-C em amostras conservadas de forma herborizada (HARTUNG et al., 2015; CHABI-JESUS et al., 2021). Na montagem do genoma o parâmetro *k-mer* do *software* SPAdes (BANKEVICH et al., 2012) é convenientemente selecionado segundo a técnica de sequenciamento aplicada: entre 15 e 19 para RNAs de pequeno tamanho, e entre 33 e 45 para RNAs enriquecidos com cauda poli A (CHABI-JESUS et al., 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Um total de 30 amostras de *Citrus* spp. provenientes de quatro estados brasileiros foram analisadas neste trabalho (Tabela 1). As amostras apresentavam sintomas de lesões localizadas cloróticas com pouca área de necrose, semelhantes aos descritos para a clorose zonada dos citros (CZ) e outras doenças causadas por vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) (Figura 11).

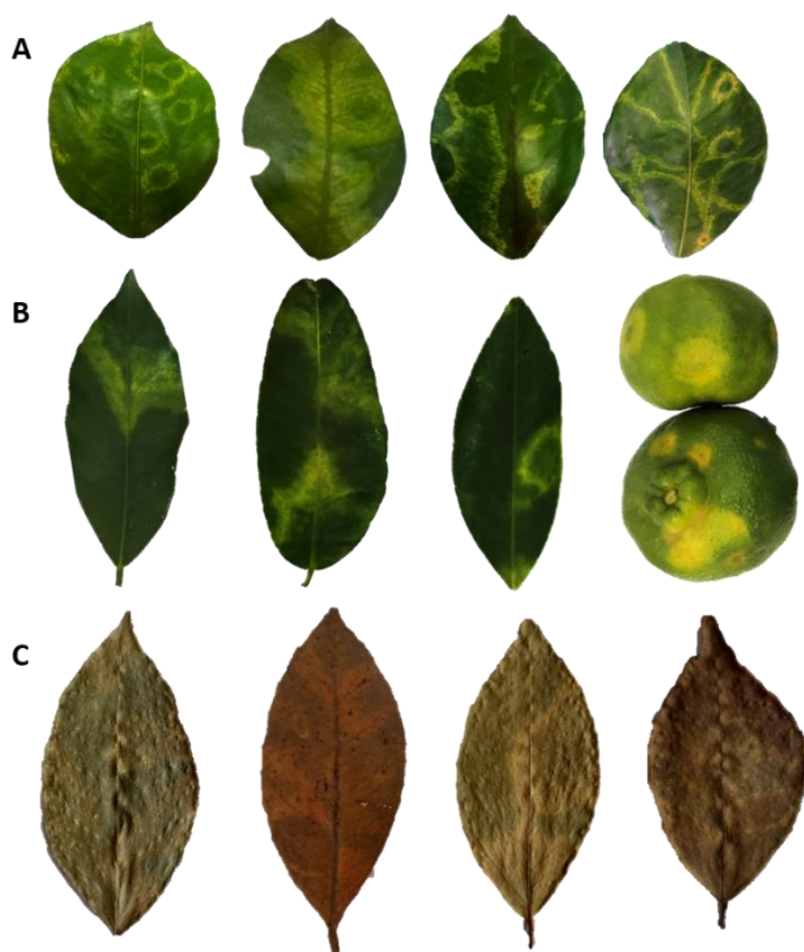


Figura 11: Frutos e folhas de *Citrus* spp. com sintomas cloróticos associados a CZ ou LC. A: Folhas de laranja Flor (*Citrus sinensis*) proveniente do BAG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, coletados em 2016. B: Amostras de tangerina (*C. reticulata*) advindas de Domingos Martins, ES, 2017. C: Folhas sintomáticas de clorose zonada dos citros conservadas no herbário do Instituto Biológico de São Paulo: *Citrus* sp., Itanhaém, SP, 1937; limão cravo (*C. limonia*), São Paulo, SP, 1965; *Citrus* sp., Campinas, SP, 1936; tangerina (*C. reticulata*), Ubatuba, SP, 1933, respectivamente.

Do total de amostras analisadas, 19 foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG-Citros) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, de Cruz das Almas, BA, no período de 2016 a 2022 (Figura 12). Duas amostras, contendo no total 11

frutos, foram coletadas na Epagri, em Itajaí, SC, em 2022. Quatro amostras de árvores cítricas de pomares de pequenos citricultores dos municípios de Domingos Martins e Venda Nova do Imigrante, ES, foram coletadas entre 2016 e 2017 com a colaboração do INCAPER, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural do Espírito Santo. Cinco das amostras analisadas correspondem a folhas cítricas herborizadas, coletadas entre os anos de 1933 e 1965 no estado de São Paulo (Tabela 1, Figura 12). Essas amostras pertencem à coleção do Herbário do Instituto Biológico de São Paulo e a maioria foi coletada pelos pesquisadores do Instituto Biológico, Dr. Agesilau Antonio Bitancourt e Dra. Victoria Rossetti.



Figura 12: Localização das amostras de *Citrus* spp. analisadas neste trabalho.

O material vegetal, majoritariamente de folhas frescas/congeladas ou herborizadas, foi utilizado para ensaios de RT-PCR para detecção e sequenciamento do agente causal. Além das análises moleculares, os tecidos frescos foram utilizados como fontes de inóculo viral para os experimentos de transmissão com ácaros *Brevipalpus*.

Amostras de tecidos com sintomas visíveis de plantas de *Citrus* spp. foram coletados para análises por MET.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas para os ensaios de transmissão do vírus. Todos os VTB-C e VTB-N testados até o momento induzem sintomas cloróticos ou necróticos nessa hospedeira experimental em tempo muito mais curto do que em suas hospedeiras naturais (ARENA et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016, 2017, 2018b, 2020, 2022).

Tabela 1: Lista de amostras de *Citrus* spp. com sintomas cloróticos analisadas neste trabalho.

Nomenclatura dos isolados	Genótipo	Ano de coleta	Local de coleta
CdA_01	Laranja Flor (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA ¹
CdA_02	Laranja Flor (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_03	Laranja Flor (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_04	Laranja Flor (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_05	Laranja Baianinha (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_06	Laranja Comum (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_07	Mexerica (<i>C. deliciosa</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_08	Tangerina Cravo (<i>C. reticulata</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_09	Clementina (<i>C. clementina</i>)	2016	Cruz das Almas – BA
CdA_10	Laranja Agridoce (<i>C. aurantium</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_11	Laranja Rubi (<i>C. sinensis</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_12	Laranja Rubi (<i>C. sinensis</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_13	Tangelo Piemonte (<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_14	Tangelo Piemonte (<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_15	Tangerina Clemenule (<i>C. reticulata</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_16	Tangor Ortanique (<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>)	2021	Cruz das Almas - BA
CdA_17	Limão Fino (<i>C. limon</i>)	2021	Cruz das Almas – BA
CdA_18	Laranja Rubi (<i>C. sinensis</i>)	2022	Cruz das Almas – BA
CdA_19	Tangelo Piemonte (<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>)	2022	Cruz das Almas – BA
Itj_01	Tangerina Batangas (<i>C. reticulata</i>)	2022	Itajaí - SC ²
Itj_02	Tangerina Swatow (<i>C. reticulata</i>)	2022	Itajaí - SC
VNI_01	<i>Citrus</i> sp.	2016	Venda Nova do Imigrante – ES ³
DMs_01	Tangerina (<i>C. reticulata</i>)	2017	Domingos Martins – ES
DMs_02	Tangerina (<i>C. reticulata</i>)	2017	Domingos Martins – ES
DMs_03	Laranja (<i>C. sinensis</i>)	2017	Domingos Martins - ES
Ubt_01	Tangerina (<i>C. reticulata</i>)	1933	Ubatuba-SP ⁴
Cmp_01	<i>Citrus</i> sp.	1936	Campinas-SP
Itn_01 e Itn_02	<i>Citrus</i> sp.	1937	Itanhaém-SP
SPa_01	Limão Cravo (<i>C. limonia</i>)	1965	Estufa IB – São Paulo – SP

¹BA – Bahia, ²SC – Santa Catarina, ³ES – Espírito Santo, ⁴SP – São Paulo.

4.2 Organograma geral do trabalho experimental

As amostras utilizadas neste trabalho são provenientes de diferentes espécies, origens, datas e estados de conservação, sendo divididas em amostras frescas ou herborizadas. Por esse motivo, as análises moleculares tiveram que ser realizadas com diferentes metodologias (Figura 13). Todas as amostras frescas foram utilizadas para ensaios de RT-PCR com iniciadores degenerados para membros da família *Kitaviridae*, iniciadores específicos para VTBs e, posteriormente, para o kitavírus HGSV2 (Figura 12A). Algumas amostras passaram por análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 13 A). As folhas herborizadas não passaram por análises de RT-PCR e MET; elas foram inicialmente identificadas pela presença de sintomas cloróticos (Figura 12A). Todas as folhas herborizadas e três amostras frescas foram selecionadas para sequenciamento de alto rendimento (HTS) utilizando protocolos distintos de purificação de RNA e sequenciamento (Figura 13 B). O genoma de um dos isolados de HGSV2 foi sequenciado pelo método Sanger depois da amplificação por PCR com 53 pares de iniciadores (Figura 13 B).

Ácaros *Brevipalpus* spp. coletados nas amostras vegetais da Bahia e de Santa Catarina foram utilizados para transmissão do HGSV2 (Figura 13 C). Além disso, as amostras foram utilizadas como fontes de inóculo de HGSV2 para aquisição por ácaros *Brevipalpus yothersi* e *B. papayensis* avirulíferos mantidos no laboratório (Figura 13 C).

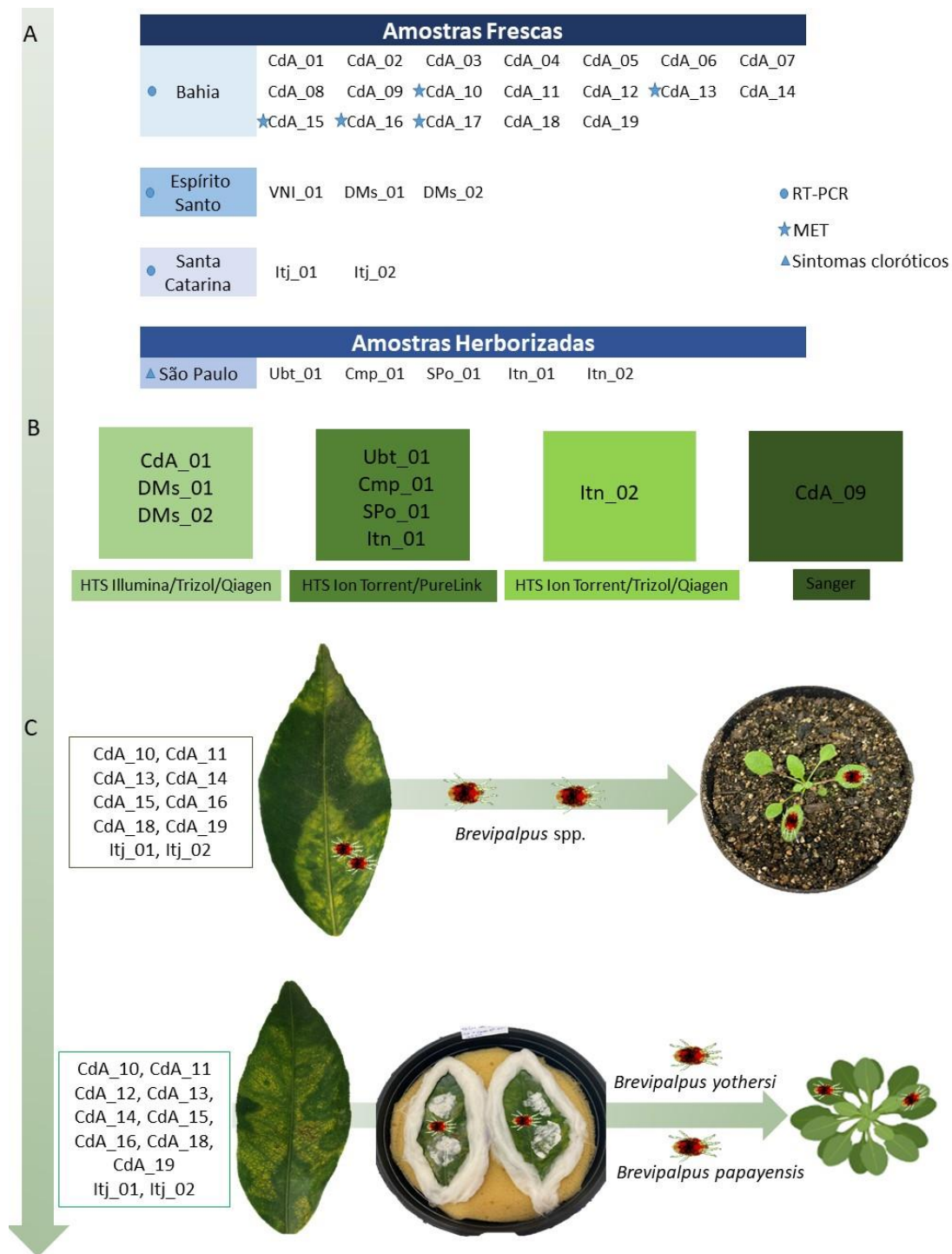


Figura 13: Organograma geral de amostras e diferentes metodologias utilizadas. A: Amostras de *Citrus* spp. frescas provenientes dos estados da Bahia, do Espírito Santo e de Santa Catarina e amostras herborizadas provenientes do estado de São Paulo. Amostras frescas submetidas a RT-PCR e MET, amostras herborizadas identificadas por sintomas cloróticos. B: Amostras utilizadas para diferentes tipos de sequenciamento de alto rendimento (HTS). Extração de RNA pelo protocolo Trizol e Qiagen e HTS pela plataforma Illumina; RNA extraído pelo PureLink e HTS pela plataforma Ion Torrent; RNA extraído com Trizol e Qiagen e HTS por Ion Torrent; e sequenciamento Sanger. C: Experimentos de transmissão com ácaros *Brevipalpus* spp. coletados diretamente de *Citrus* spp. infectados com HGSV2 e transferidos diretamente para plantas de *A. thaliana*. D: Experimentos de transmissão utilizando fontes de inóculo de HGSV2 como arena de ácaros *Brevipalpus papayensis* e *B. yothersi* para alimentação e aquisição e posteriormente transferidos para *A. thaliana*.

4.3 Criação de ácaros do gênero *Brevipalpus*

Na ULR em Biologia Molecular Aplicada do Instituto Biológico, SP, foram estabelecidas populações de ácaros *Brevipalpus yothersi* e *B. papayensis* para sua utilização nos experimentos de transmissão.

Duas populações diferentes de ácaros *B. yothersi* avirulíferos foram mantidas no laboratório. Ambas as populações possuem eficiência de transmissão diferente de VTBs (Tassi et al., dados não publicados) e são mantidas nas hospedeiras originais dos VTBs ou em feijão de porco (*Canavalia ensiformis*). A população A1, que transmite eficientemente o CiLV-C, foi gerada a partir de uma isolinha (uma única fêmea) do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP. Essa população foi mantida em frutos de laranja doce coletados em plantas cultivadas no IB-SP e higienizados com esponja e sabão neutro. Alternativamente, os frutos foram obtidos de comércios e nesse caso foram tratados com o produto Veggie Wash (Citrus Magic®, Beaumont Products, Inc., Kennesaw, GA, EUA) e lavados com água logo em seguida. Posteriormente, foi adicionada cola entomológica ao redor de uma área na qual foi depositada uma mistura autoclavada aquosa de farinha de trigo, gesso e areia fina, na proporção 1:1:2 para simular microcavidades que servem de refúgio para a oviposição dos ácaros *Brevipalpus* (RODRIGUES et al., 2007). Para a reposição, os novos frutos foram encostados nos antigos permitindo uma movimentação natural dos ácaros entre eles.

A segunda população, A2 avirulífera de *B. yothersi*, que transmite eficientemente PfGSV, foi gerada a partir de uma isolinha cedida pela Dra. Aline Tassi, pós-doc da ULR-BMA do Instituto Biológico e bolsista Fapesp (proc. 2018/12252-8). Os ácaros foram mantidos em folhas saudáveis de maracujazeiro (*Passiflora* sp.) ou de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), sobre um prato com espuma e algodão umedecido ao redor da folha. Uma mistura de farinha, gesso e areia (RODRIGUES et al., 2007) foi depositada formando uma faixa na zona central das folhas, ou sobre os sintomas (Figura 13). As plantas de feijão foram mantidas em sala climatizada e os pés de maracujá em casa de vegetação. As folhas foram coletadas e lavadas gentilmente com detergente neutro. Para a propagação das populações, as folhas senescentes foram convenientemente cortadas e encostadas nas folhas novas.

A população de *B. papayensis* foi gerada a partir de uma isolinha também cedida pela Dra. Aline Tassi. A população foi mantida em folhas saudáveis de café (*Coffea* sp.)

coletadas no IB-SP. As folhas de café foram preparadas e mantidas de maneira idêntica às folhas usadas para manter a população de *B. yothersi*.

4.4 Detecção de VTBs presentes no Brasil mediante RT-PCR

Para detectar possíveis VTBs presentes nas amostras foram utilizados aproximadamente 100 mg de tecidos de folhas ou frutos de *Citrus* spp. As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e submetidas ao protocolo de extração de RNA total com o reagente TRIzol™, de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os materiais utilizados para o manuseio de RNA são preparados com emulsão de DEPC (pirocarbonato dietil, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 0.01% e esterilização a 120°C.

A partir de 2 µL de extratos de RNA, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com o *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV) ou GoScript™ Reverse Transcriptase Mix (Promega Corp., Madison, EUA), utilizando iniciadores randômicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com 1 µL de cDNA e GoTaq® Green Master Mix de acordo com o fabricante (Promega, Madison, EUA).

Para a detecção dos VTBs que infectam citros no Brasil foram utilizados três pares de iniciadores específicos para o CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; CHABI-JESUS et al., 2021); um para o CiLV-N (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017) e um para o CiCSV (CHABI-JESUS et al., 2018). Além deles, iniciadores para a detecção de CiLV-C2 (ROY et al., 2013), HGSV2 (MELZER et al., 2013a) e OFV-citros (ROY et al., 2014), vírus que infectam citros mas não foram relatados no Brasil, e iniciadores degenerados que amplificam regiões conservadas de vírus membros da família *Kitaviridae* (MELZER et al., sequências não publicadas) também foram utilizados. Todas as amostras foram testadas com o par de iniciadores NAD5 (LEE; CHANG, 2006) usado como controle interno da qualidade da extração de RNA e dos reagentes e condições da RT-PCR (Tabela 2). Os extratos de RNA das amostras herborizadas não passaram pelo protocolo de detecção, apenas sequenciamento de alto rendimento (HTS).

Tabela 2: Lista dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-PCR. O par de iniciadores *NAD5* foi usado para verificar a qualidade dos extratos de RNA e das reações subsequentes.

VTBs	ORF alvo	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
CiLV-C	<i>p29</i>	F: ATGAGTATCGTAACTTTCACCTTTGAC R: ACCAGAGATTAGCGATTCAAAA	864	RAMOS-GONZÁLEZ et al. (2016)
	<i>MP</i>	F: GCGTATTGGCGTTGGATTCTGAC R: TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT	339	LOCALI-FABRIS et al. (2006)
	<i>p24</i>	F: CGCAGTTTCCTAATAACACC R: GGGAGTTCAGCATAAAGC	322	CHABI-JESUS et al. (2021)
CiLV-C2	<i>p29</i>	F: ATGAGTAACATTGTGTCGTTTTTCGTTGT R: TCACTCTTCCTGTTTCATCAACCTGTT	795	ROY et al. (2013)
CiLV-N	<i>N</i>	F: CCGTACCCATTGTGAAAATA R: GAACCCCTTTGAGGAATG	420	RAMOS-GONZÁLEZ et al. (2017)
CiCSV	<i>L</i>	F: CACATCATATACTGAAACAAACC R: TCAAACCTGAGCTCCCAAT	933	CHABI-JESUS et al. (2018)
OFV-citros	<i>N</i>	F: ATGGCTAACCCAAAGTGAGATCGATTA R: AGTTGCCTTGAGATCATCACATTGGT	673	ROY et al. (2014)
HGSV2	<i>RdRp</i>	F: GCGACGGGAAAAATACTGAAG R: CGCAGTCACAGACGTA AAC	198	MELZER et al. (2013a)
NAD 5	<i>NAD5</i>	F: GCTTCTTGGGGCTTCTTGTTTCGATA R: ATCTCCAGTCACCAACATTGGCAT	185	(LEE; CHANG, 2006)

A ausência de CiLV-C nas populações avirulíferas dos ácaros *Brevipalpus* mantidas no laboratório foi confirmada por RT-PCR. A extração do RNA dos ácaros foi realizada pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (KUBO et al., 2009). A maceração foi efetuada com 10 ácaros em tubos de 1,5 ou 2 mL com pistilos de plástico ou vidro. A síntese de cDNA se realizou com 3 µL de RNA e para os ensaios de detecção por PCR foram utilizados três pares de iniciadores para a detecção de CiLV-C (*p29*, *p24* e *MP*) (Tabela 2). Além dos controles da reação (brancos de cDNA e PCR), foram usados controle positivo do CiLV-C e controle da extração do ácaro com o gene *GAPDH* (ROGERIO et al., 2019).

Os possíveis produtos das RT-PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% feito com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta (UV).

4.5 Detecção de VTBs mediante microscopia eletrônica de transmissão

Cinco amostras de *Citrus* spp. com sintomas cloróticos foram selecionadas para análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras são de laranja Agridoce (*C. aurantium*) (CdA_10), tangelo Piemonte (*C. sinensis* x *C. paradisi*) (CdA_13), tangerina Clemmenule (*C. reticulata*) (CdA_15), tangor Ortanique (*C. sinensis* x *C. reticulata*) (CdA_16) e limão Fino (*C. limon*) (CdA_17), coletadas em Cruz das

Almas, BA, em 2021. Além dessas, foram selecionados 15 fragmentos de folhas sintomáticas de *Arabidopsis thaliana* dos experimentos de transmissão realizados neste trabalho. As lesões dos tecidos foliares foram cortadas em pequenos fragmentos com lâminas de barbear novas e fixadas em uma solução de Karnovsky modificada que contém 2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de 0,05 M, pH 7.2 (KITAJIMA; NOME, 1999). As amostras para análises por MET foram preparadas e visualizadas em um microscópio Zeiss EM 900 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) como descrito anteriormente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; TASSI et al., 2017).

4.6 Sequenciamento de alto rendimento (HTS) e identificação de possíveis

VTBs

4.6.1 Sequenciamento de mRNA usando a plataforma Illumina

Para o HTS a partir de RNA mensageiro (mRNA) foram selecionadas três amostras de tecidos frescos cujo RNA havia sido extraído e armazenado em ultrafreezer a -80°C, uma delas de *C. sinensis* (CdA_01) e duas de *C. reticulata* (DMs_01 e DMs_02), provenientes dos estados da Bahia e Espírito Santo e coletadas entre os anos 2016 e 2017 (Tabela 3). As amostras utilizadas foram as primeiras recebidas e foram selecionadas a partir dos sintomas cloróticos e quantidade de tecido vegetal e RNA extraído. A extração de RNA total foi realizada com o reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e a purificação do extrato foi finalizada utilizando o RNAeasy® Mini Kit QIAGEN (Venlo, Holanda) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os extratos de RNA total foram enviados para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Esalq - USP, em Piracicaba, SP, onde foi realizado o enriquecimento de cauda poli (A) e a montagem das bibliotecas de cDNA com o Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, EUA). O sequenciamento foi realizado através do HiSeq 2500 Technology (leituras de 150 pares de nucleotídeos) (Illumina, San Diego, EUA), com o HiSeq SBS v4 High Output Kit (Illumina, San Diego, EUA).

4.6.2 Estabelecimento de um protocolo de extração de RNA de pequeno tamanho e sequenciamento pela plataforma Ion Torrent

Os viromas das amostras de tecidos herborizados foram estudados através do sequenciamento da fração do RNA de pequeno tamanho (siRNA) utilizando-se a plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). O procedimento é recomendado considerando o alto nível de degradação do RNA nessas amostras e tomando como referência trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa que recuperou

siRNAs de CiLV-C em amostras herborizadas (CHABI-JESUS et al., 2021). A montagem das bibliotecas de siRNA, o sequenciamento, e as análises bioinformáticas foram realizados integralmente pelo nosso grupo de pesquisa no Instituto Biológico de São Paulo.

Quatro amostras de folhas herborizadas coletadas no estado de São Paulo entre os anos 1933 e 1969 foram selecionadas para essas análises: *C. reticulata* (Ubt_01), *Citrus* sp. (Cmp_01 e Itn_01) e *C. limonia* (SPa_01) (Tabela 3). A extração e purificação do siRNA destas amostras foi através do PureLink™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O isolado Itn_02 é derivado da mesma planta de Itanhaém Itn_01, porém os extratos de RNA dos dois isolados foram obtidos por dois protocolos distintos, para fins de comparação dos procedimentos. Numa delas, Itn_01, a extração de siRNA foi realizada usando PureLink™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), na segunda amostra, Itn_02, a extração se realizou com o reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) com uma modificação na quantidade inicial de tecido (20 mg) e uma subsequente purificação mediante cromatografia de afinidade utilizando as colunas do RNeasy® Mini Kit e MinElute® (QIAGEN, Venlo, Holanda). A amostra de limão Cravo (SPa_01) é proveniente de um experimento de transmissão do agente causal da clorose zonada por ácaros *Brevipalpus phoenicis* sensu lato realizado no Instituto Biológico no ano de 1965 (ROSSETTI et al., 1965a).

Tabela 3: Lista de amostras de *Citrus* spp. selecionadas para sequenciamento de alto rendimento (HTS) e seus respectivos métodos de extração.

Isolado	Genótipo	Ano	Local de coleta	Método sequenciamento	Métodos de extração e purificação
CdA_01	Laranja Flor (<i>C. sinensis</i>)	2016	Cruz das Almas, BA	HTS Illumina	Trizol, Qiagen
DMs_01	Tangerina (<i>C. reticulata</i>)	2017	Domingos Martins, ES	HTS Illumina	Trizol, Qiagen
DMs_02	Tangerina (<i>C. reticulata</i>)	2017	Domingos Martins, ES	HTS Illumina	Trizol, Qiagen
Ubt_01	<i>Citrus</i> sp.	1933	Ubatuba, SP	HTS Ion Torrent	PureLink
Cmp_01	<i>Citrus</i> sp.	1936	Campinas, SP	HTS Ion Torrent	PureLink
Itn_01	<i>Citrus</i> sp.	1937	Itanhaém, SP	HTS Ion Torrent	Purelink
Itn_02	<i>Citrus</i> sp.	1937	Itanhaém, SP	HTS Ion Torrent	Trizol, Qiagen
SPa_01	Limão Cravo (<i>C. limonia</i>)	1965	São Paulo, SP	HTS Ion Torrent	Purelink

A partir do extrato de RNA total foi feito o enriquecimento da fração de siRNA e a construção das bibliotecas utilizando o protocolo Ion Total RNA-Seq kit v2 for Small RNA Libraries (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Algumas modificações foram realizadas no passo 6A do protocolo recomendado para o kit, com a adição de 500 µL de *Wash Solution*, ao invés de 150 µL. No passo 7 foi adicionada uma etapa na qual as

amostras foram colocadas em rack magnética por um minuto. As bibliotecas foram montadas automaticamente nos chips mediante o uso do Ion 540® Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e sequenciadas no equipamento Ion GeneStudio™ S5 System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Ambos os processos foram executados no Laboratório de Viroses de Bovídeos (LVB) no Instituto Biológico de São Paulo.

Como controle e para fins de comparação dos procedimentos, uma amostra do material herborizado com sintomas de clorose zonada (Itn_02) e outras folhas frescas de laranja doce infectadas com CiLV-C foram processadas em paralelo. A avaliação da integridade do RNA extraído foi através do equipamento Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, EUA) no laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Faculdade de Medicina da USP, SP. Uma outra ponderação dos dois protocolos foi feita com as bibliotecas obtidas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), avaliando a quantidade de *reads* e *contigs* específicos aos vírus estudados que foram montados.

4.7 Montagem de genomas virais e anotação genômica

Os extratos de RNA foram processados de forma independente e oito bibliotecas foram submetidas a HTS. O sequenciamento gerou milhões de leituras (*reads*) em pares de base (pb) em arquivos FastQ, a qualidade dos *reads* foi verificada usando o programa FastQC (ANDREWS, 2010) e as sequências adaptadoras foram removidas usando o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014).

A montagem *de novo* dos *contigs* a partir da sobreposição dos *reads* foi com o programa SPAdes disponível no *software* Geneious Prime (v.2021.0.1) (Geneious, Auckland, Nova Zelândia) (BANKEVICH et al., 2012) e foram usados tamanhos diferentes de *k-mer* para bibliotecas de sRNA e mRNA, conforme descrito anteriormente (CHABI-JESUS et al., 2021). Os *contigs* gerados foram identificados usando o Basic Local Alignment Search Tool (BLASTx/ BLASTn) implementado no Geneious Prime (v.2021.0.1) (Geneious, Auckland, Nova Zelândia) (KEARSE et al., 2012) e usando sequências de referências disponíveis na base de dados RefSeq (NCBI, National Center for Biotechnology Information) (HATCHER et al., 2017) e outras ainda não disponíveis publicamente e que estão no repositório de sequências da ULR-BMA do Instituto Biológico, SP. O *software* Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) também foi utilizado na comparação de sequências após a montagem dos genomas.

A identificação das ORFs virais dos genomas obtidos foi feita através da ORF finder¹ no NCBI e do Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As ORFs virais foram traduzidas no Vector NTI® e avaliadas para a presença de peptídeos sinais, domínios conservados e domínios transmembranas. A presença de peptídeos sinais foi detectada em SignalP v.5.04² (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019) e os possíveis domínios conservados identificados mediante o uso de MOTIF Search³. As hélices transmembranas nas proteínas virais foram identificadas usando o TMHMM Server 2.06⁴ (SONNHAMMER; VON HEIJNE; KROGH, 1998) e o Deeploc v.17⁵ (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2017), conforme descrito anteriormente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022). Os tamanhos (kDa) das proteínas traduzidas no Vector NTI® foram conferidas no protein molecular weight⁶.

4.8 Desenvolvimento de iniciadores para detecção e validação do genoma completo de HGSV2 em amostras coletadas no Brasil

Os iniciadores para amplificação do HGSV2 foram projetados com base em uma primeira versão do genoma do isolado DMs_01, obtido por meio de HTS e selecionado como o isolado de referência deste vírus no Brasil. As sequências dos iniciadores para obtenção de fragmentos parcialmente sobrepostos do HGSV2 foram selecionadas através do programa Geneious Prime (versão 2021.0.1) (Geneious, Auckland, Nova Zelândia). Ao total foram projetados 53 iniciadores, 22 para o RNA1, 15 para o RNA2, e 16 para o RNA3 (Tabela 4).

A especificidade dos iniciadores foi conferida *in silico* no programa Vector NTI utilizando o genoma do HGSV2 isolado DMs_01. A temperatura de *melting* (T_m) foi conferida com a ferramenta OligoAnalyzer no site Integrated DNA Technologies⁷ e a temperatura de anelamento (T_a) para as PCRs foi obtida subtraindo 3 a 5 °C da T_m. A T_a foi padronizada a 56°C para todos os iniciadores. O tempo de extensão de cada reação variou conforme as combinações de pares de iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) envolvidos, que geralmente dirigem a síntese de fragmentos entre 900 e 1600 pares de base (pb).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

² <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>

³ <https://www.genome.jp/tools/motif/>

⁴ <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/index.php>

⁶ https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html

⁷ <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

Tabela 4: Iniciadores desenhados neste trabalho para a amplificação e o ressequenciamento Sanger do genoma completo de HGSV2.

Iniciador	Sequência dos iniciadores 5'- 3'	Iniciador	Sequência dos iniciadores 5'- 3'
RNA 1			
1F	TCACAAGGATTCTAACAAGC	6R	GATCATCCTCAACAACCTCC
1R	CGAAACATGTCCTCATTGTA	7F	ATGCTACGGGTTGTGAGATA
2F	GAACAACATATATTCGGTACCAC	7R	GTGCAGCATCCAAAAATCT
2R	CAATCTATGTCTCCTTTCCACC	8F	GTTTGAGGACATATCGAAGG
3F	TGTTTGATCAAGTGATGAGG	8R	ACAAATCCTCCTTCACAAAA
3R	TGGAATGCTTCTTTGATCT	9F	GCCTTTTAATAGGTCGTTCA
4F	GGATTTCGGTGTATGAGAAGA	9R	GTCGTCACAAACAAACTTCA
4R	GGATAGAAAAGAAGGAACACG	10F	ACTGAGAACAAGGAGCAGAT
5F	ATGAGGATGATCCATTGGT	10R	TCAACAATGATTTCTTTATGC
5R	GACCATCGTAGACCAAATCT	11F	GTGCCGGATAGGGTAGTT
6F	GTCTGGTTTTGCTCCTCTT	11R	CCTTCTCCAACACCAACA
RNA2			
1F	TCTTTTGGCTGGTCTAGAAG	3R	GCAACCAGTTTCAAAGATG
1Fa	GTTACTGTGACAGGTAACGT	3Ra	GTATATCAGCAGAGCGAACA
1R	ATGAACAAACTGGGCCTAC	4F	GATATTACGCCCGTAAGT
1Ra	GAGCATGTTACTGACCAGAA	4R	AACAACAACCAACAAGATCA
2F	GATATCCATATCGATCCTGTG	5F	CGATATTTCAAGGTCAAGCG
2R	CACAAACTTGGTCTTACCAC	5R	ATGGAGAGAAAACCAAAAA
3F	GATGAGGTTGATGACGATG	5Ra	AGAAGAAGACAGGAAACCAC
3Fa	GTTTTGTGGGATGGTCTT		
RNA 3			
1F	AGGTTGTGTATGGTTGTTG	2Ra	AGCCAACAGATTCATCGG
1Fa	TTATCACCTAGACGCTGTA	3F	TCTACGTAGGACGAGTGATG
1Fb	GCGAGATAGTGCTATCGC	3R	GAGTAAACGTGCAAAGACAC
1Fc	AATTCTGCTGAGGTGATACC	4F	GGTAGTTTACAATAAAGGTGAGG
1R	AGACAAGCTAGCCGAACACTAC	4R	CGCGCTTTATAACTGGTAA
1Ra	ACGAAACACATTCACAATCG	4Ra	AGAACATGCAAGAAACTCG
2F	GGTCTGATGTTGTCAGAGT	4Rb	CTGCAAAACCCGCTTATTC
2R	GCATAAACAAACCAGCAAT	4Rc	CAGGGAAAAGAGAAAGGAAAA

Para a validação por RT-PCR do genoma completo do HGSV2, o cDNA foi sintetizado com o M-MLV (Promega Corp., Madison, EUA). A PCR foi realizada com enzima de alta fidelidade Time Hifi DNA Polymerase (ECRA, Biotec Serviços e Pesquisa, Santo André, Brasil), seguindo a recomendação do fabricante e visando sequências com menor chances de erro. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, com tampão de corrida TAE 1x e corado com brometo de etídio 1 µg/mL.

Iniciadores que amplificam uma região do gene *RdRp* de HGSV2 (Tabela 2) (MELZER et al., 2013a) foram testados conforme descrito no item 4.3. Adicionalmente, com o intuito de ampliar as possibilidades de detecção do vírus, novos iniciadores foram desenhados tendo como alvos regiões possivelmente mais conservadas e mais expressas dos RNA2 e RNA3 desse higrvírus. Os iniciadores selecionados foram validados por RT-PCR e os resultados comparados com o par de iniciadores disponível na literatura.

O isolado CdA_09 foi selecionado para amplificação do genoma completo por RT-PCR. Os fragmentos obtidos foram re-amplificados e purificados com o protocolo PEG 6000 (SCHMITZ; RIESNER, 2006). Os produtos foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e sequenciados pelo método Sanger.

O sequenciamento pelo método Sanger foi montado numa placa com o volume final de 10 μ L, sendo 5 μ L dos reagentes do kit do sequenciamento Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e os outros 5 μ L distribuídos entre amostra, iniciador e água (se necessário). A quantidade de amostra variou dependendo da concentração de DNA (ng/ μ L) e do tamanho do fragmento. O cálculo foi realizado conforme as recomendações do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências-USP⁸ utilizada a fórmula $V=m/c$, na qual (V) representa o volume utilizado da amostra na mistura de reação, (m) a proporção entre tamanho (pb) e quantidade (ng) da PCR, de acordo com o centro de estudos; e (c) concentração em ng/ μ L. A quantidade padrão de iniciador é 0,3 μ L (na concentração 10 μ M) e a água até completar o volume final da reação (10 μ L). Depois dos ciclos de amplificação, os produtos foram processados pelo sequenciador 3500xL – AB Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) no LVB do Instituto Biológico de São Paulo, com a colaboração do Dr. Ricardo Harakava, da ULR-BMA, IB-SP. As sequências foram analisadas com o uso de CLUSTAL W implementado no pacote Vector NTI® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) versão Advanced v.10.

4.9 Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas do isolado do HGSV2 DMs_01, as sequências de vírus da família *Kitaviridae*, *Virgaviridae*, grupo negevírus e outros vírus parecidos com os kita/negevírus foram obtidas através de uma busca BLASTX no GenBank. A árvore filogenética foi realizada com a proteína RdRp dos vírus. As sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o MAFFT8 (KATO & STANDLEY, 2013). O alinhamento foi curado com o software BMGE (CRISCOULO & GRIBALDO, 2010) implementado no NGPhylogeny (LEMOINE et al., 2019). Os parâmetros BMGE foram utilizados de acordo com o site, com exceção do *sliding windows size* que foi =7. O modelo de substituição e a árvore de máxima verossimilhança filogenética foram obtidos com o uso

⁸ <https://genoma.ib.usp.br/protocolo-de-preparacao-da-reacao-de-sequenciamento-para-usuarios-da-opcao-a-produtos-de-pcr/130>

do software W-IQ-Tree v. 1.6.12 (TRIFINOPOULOS et al., 2016). A árvore foi visualizada e editada no Interactive Tree Of Life (iTOL) (LETUNIC & BORK, 2021). As sequências dos vírus da família *Virgaviridae* foram utilizados como grupo externo.

4.10 Identificação morfoanatômica de *Brevipalpus* e transmissão experimental de isolados brasileiros do HGSV2 a plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para avaliar se o ácaro *Brevipalpus* sp. transmite o HGSV2 foi realizado um experimento de transmissão na ULR-BMA, IB-SP. Amostras com sintomas cloróticos recebidas do BAG-Citros da Embrapa, Cruz das Almas, BA (CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_14, CdA_15, CdA_16, CdA_18, CdA_19), referentes ao experimento I, e da Epagri, Itajaí, SC (Itj_01 e Itj_02, *C. reticulata*), referentes ao experimento II, foram utilizadas como fontes de inóculo do HGSV2 (Tabela 5). A presença de HGSV2 foi verificada de acordo com o item 4.3. Os ácaros foram transferidos para plantas de *A. thaliana*. As sementes das plantas foram germinadas após incubação em câmara fria a 4°C em ambiente escuro por 72 h e posteriormente mantidas em câmara de crescimento Adaptis AR A1000 (Conviron, Winnipeg, Canadá) com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 22°C ± 2°C durante todos os experimentos de transmissão.

O experimento de transmissão consistiu na coleta de cerca de 20 ácaros *Brevipalpus* supostamente virulíferos nas fontes de inóculos com o auxílio de um pincel de poucos pelos e um microscópio estereoscópico. Os ácaros foram transferidos diretamente para quatro plantas de *A. thaliana* (Tabela 5). Três ovos foram coletados nessas plantas e os ácaros que eclodiram foram analisados morfoanatomicamente para a sua identificação.

As folhas foram coletadas 15 dias após a infestação por ácaros conforme aparição de manchas cloróticas/necróticas e foram maceradas com o auxílio do equipamento FastPrep-24™ (MP Biomedicals, Santa Ana, EUA) ou almofariz e pistilo resfriados com nitrogênio líquido. A extração de RNA e a RT-PCR foram realizadas conforme descrito no item 4.3, utilizando-se iniciadores para o gene *RdRp* de HGSV2 (MELZER et al., 2013a).

Tabela 5: Lista de plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para o experimento de transmissão com ácaros *Brevipalpus* spp. das fontes de inóculo de HGSV2

Número da planta-teste (<i>A. thaliana</i>)	Nº do experimento	Fontes de HGSV2	Data	Análises
At_01	I	CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_14, CdA_15, CdA_16, CdA_17	2021	RT-PCR e MET
At_02	I	CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_14, CdA_15, CdA_16, CdA_17 CdA	2021	RT-PCR
At_03	I	CdA_18 e CdA_19	2022	RT-PCR
At_04	II	Itj_01 e Itj_02	2022	RT-PCR

Nas plantas de *Citrus* spp. provenientes do BAG-Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, BA, utilizadas como fontes de inóculo de HGSV2, além dos ácaros vivos, foram encontradas as carcaças de oito espécimes. Os ácaros ou as carcaças foram montados e visualizados para microscopia em Zeiss Axioimager microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha) conforme descrito anteriormente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) os ácaros foram desidratados e visualizados no JEM IT 300 conforme descrito em RAMOS-GONZÁLEZ et al. (2017). Os parâmetros morfológicos usados na identificação foram conforme descritos em BEARD et al. (2015).

4.11 Transmissão experimental de isolados brasileiros do HGSV2 por ácaros *Brevipalpus papayensis* e *B. yothersi* para plantas de *A. thaliana*

Folhas de *Citrus* spp. das amostras CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_14, CdA_15, CdA_16, CdA_18, CdA_19, Itj_01 e Itj_02 (Tabela 1, Figura 12) foram usadas como fontes de inóculo do HGSV2. As folhas foram preparadas conforme o item 4.2 e mantidas em temperatura ambiente. As plantas de *A. thaliana* foram mantidas em câmara de crescimento com ambiente controlado durante todo o experimento de acordo com o descrito no item 4.9.

Das fontes de inóculo, 11 foram selecionadas para montagens de arenas de alimentação, 27 folhas para *B. yothersi* e 11 folhas para *B. papayensis*. Entre 30 e 50 ácaros de cada uma das espécies foram transferidos para cada arena individual com inóculo de HGSV2, onde permaneceram entre 4 e 7 dias (período de aquisição viral). Posteriormente, cerca de 15 ácaros foram transferidos para cada planta de *A. thaliana* na seguinte distribuição: 23 plantas de *A. thaliana* receberam *B. yothersi* e dez receberam *B. papayensis* (Tabela 6). O número de plantas, e em alguns casos o número de folhas inoculadas, foi menor para *B. papayensis* porque foi recuperado um número menor de indivíduos em comparação ao *B. yothersi*.

As folhas foram coletadas após a aparição de sintomas cloróticos/necróticos ou antes da sua senescência. Cerca de 20 ácaros *B. yothersi* foram transferidos para duas plantas saudáveis de laranja doce (*C. sinensis*). Fontes de *A. thaliana* e *C. sinensis* saudáveis foram mantidas como controles negativos do experimento. A extração do RNA das folhas, a síntese de cDNA e a PCR foram realizadas conforme item 4.3.

Tabela 6: Lista de plantas de *A. thaliana* utilizadas para os experimentos de transmissão realizados com ácaros *Brevipalpus yothersi* e *B. papayensis*.

Número da planta-teste (<i>A. thaliana</i>)	Nº do experimento	Infestação com <i>Brevipalpus</i>	Fontes de inóculo	Ano de coleta	Análises
At_05	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_14	2021	RT-PCR
At_06	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_12	2021	RT-PCR e Sanger
At_07	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_19	2022	RT-PCR
At_08	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_19	2022	RT-PCR
At_09	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_18	2022	RT-PCR
At_10	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_18 e CdA_19	2022	RT-PCR
At_11	III	<i>B. papayensis</i>	At_10	2022	RT-PCR
At_12	IV	<i>B. papayensis</i>	Itj_01	2022	RT-PCR
At_13	IV	<i>B. papayensis</i>	Itj_02	2022	RT-PCR
At_14	III	<i>B. papayensis</i>	CdA_18	2021	RT-PCR
At_15	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_13	2021	RT-PCR e MET
At_16	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_13	2021	RT-PCR
At_17	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_10	2021	RT-PCR
At_18	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_11	2021	RT-PCR
At_19	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_10	2021	RT-PCR e MET
At_20	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_12	2021	RT-PCR e MET
At_21	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_13	2021	RT-PCR
At_22	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_12	2021	RT-PCR e MET
At_23	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_10	2021	RT-PCR e MET
At_24	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_10	2021	RT-PCR e MET
At_25	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_10	2021	RT-PCR e MET
At_26	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_11	2021	RT-PCR
At_27	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_14	2021	RT-PCR
At_28	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_12	2021	RT-PCR
At_29	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_14	2021	RT-PCR
At_30	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_14	2021	RT-PCR
At_31	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_12	2021	RT-PCR
At_32	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_14	2021	RT-PCR
At_33	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_14	2022	RT-PCR
At_34	VI	<i>B. yothersi</i> (A1)	CdA_19	2022	RT-PCR
At_35	VII	<i>B. yothersi</i> (A1)	Itj_02	2022	RT-PCR
At_36	VII	<i>B. yothersi</i> (A1)	Itj_01	2022	RT-PCR
At_37	V	<i>B. yothersi</i> (A2)	CdA_18	2021	RT-PCR e MET

5. RESULTADOS

5.1 Manchas cloróticas em folhas e frutos de citros representam três subtipos de sintomas

As amostras de tecidos foliares de *Citrus* spp. recebidas da Bahia e do Espírito Santo apresentavam manchas cloróticas em formato de anéis, circulares ou sem formato definido, mas com pouco ou nenhum tecido necrótico. Após análise detalhada desses sintomas não foi possível observar um padrão de lesões para uma mesma espécie ou uma mesma localidade, mas elas foram divididas em três tipos. Em um deles, anéis cloróticos e linhas com tons verdes claros, escuros e amarelados se apresentam na folha inteira ou grande parte dela (Figura 14 A). O segundo tipo se caracteriza pela presença de uma mancha clorótica ao longo, e em ambos os lados, da nervura central das folhas, formando o que se conhece como folha de carvalho (Figura 14 B). O terceiro tipo de sintoma são manchas cloróticas circulares, com bordas mais ou menos regulares, distribuídas aleatoriamente na área foliar (Figura 14 C). Dos três tipos de sintomas caracterizados, ao menos dois deles podem estar presentes numa mesma planta e podem indicar fases diferentes do desenvolvimento da doença. No geral, as amostras de frutos do Espírito Santo e de Santa Catarina apresentam o mesmo tipo de sintomas de anéis cloróticos sem tecido necrosado, semelhante ao primeiro tipo (Figura 14 D).

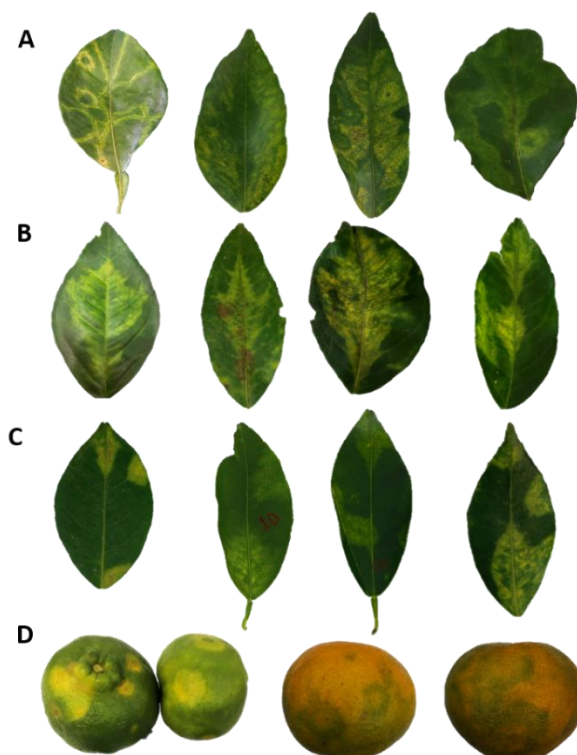


Figura 14: Folhas com manchas cloróticas em diferentes formatos. A: anéis cloróticos e linhas com tons verdes claros, escuros e amarelados por toda a folha das amostras CdA_01, CdA_13, CdA_13 e CdA_14, respectivamente. B. Clorose que acompanha a nervura de ambos os lados nas amostras CdA_11, CdA_17, CdA_10 e CdA_18. C: Sintomas cloróticos circulares distribuídos aleatoriamente nas amostras CdA_10, CdA_14, CdA_14 e CdA_10. D: Sintomas cloróticos em formato de anéis em frutos das amostras DMs_01, Itj_01 e Itj_02.

5.2 RT-PCR com iniciadores degenerados indicam a presença de kitavírus nas amostras do Espírito Santo e da Bahia

As amostras frescas CdA_01, CdA_03 a CdA_09, DMs_01, DMs_02 e VNI_01 foram submetidas a ensaios de RT-PCR para avaliar a presença dos VTBs CiLV-C, CiLV-N, CiCSV, CiLV-C2 e OFV, mas as análises foram negativas (dados não mostrados). Entretanto, em cinco amostras, CdA_04, CdA_08, VNI_01, DMs_01 e DMs_02 foram obtidos *amplicons* do tamanho esperado (~ 400 pb) com um par de iniciadores degenerados que amplifica parte do gene *RdRp* de membros da família *Kitaviridae* (Figura 15). Na amostra (CdA_04), além da banda esperada, observou-se uma banda de 300 pb, que pode ser um produto inespecífico da reação.

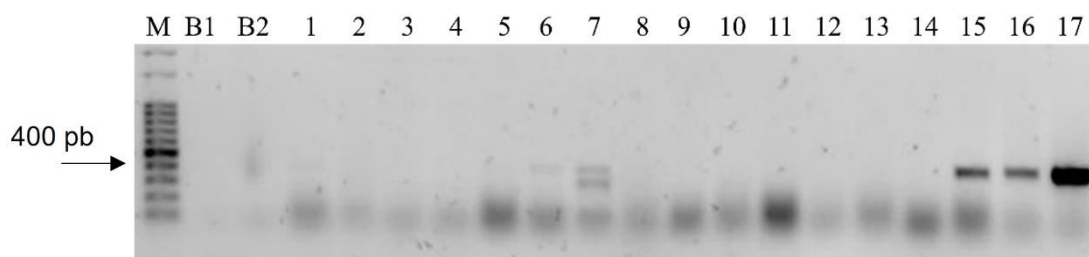


Figura 15: Gel de agarose a 1% da detecção de kitavírus por RT-PCR em amostras de *Citrus* spp. utilizando um par de iniciadores degenerados que amplifica parte do gene *RdRp* de membros da família *Kitaviridae*. Tamanho do fragmento esperado: ~400 pb. M: marcador molecular Promega 1 Kb. B1: Branco de PCR, B2: Branco de cDNA. 1- *Citrus* sp. (VNI_01), 2- Laranja flor (CdA_03), 3- Laranja baianinha (CdA_05), 4- Laranja (CdA_06), 5- Mexerica (CdA_07), 6- Tangerina Cravo (CdA_08), 7- Laranja flor (CdA_04), 8- 9- Tangerina Clementina (CdA_09), 10-14 - Laranja flor (CdA_01) 15- Tangerina (DMs_01), 16- Tangerina (DMs_02), 17- Controle positivo de *Citrus* sp. com CiLV-C.

5.3 MET sugere a presença de vírions em amostras de citros com sintomas de CZ

Após os ensaios de RT-PCR com iniciadores degenerados indicarem a presença de kitavírus, novas amostras de campo foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises a partir de cortes ultrafinos de tecidos exibindo sintomas cloróticos dos isolados da Bahia de 2021, CdA_10, CdA_13, CdA_15, CdA_16 e CdA_17 foram examinadas por nosso colaborador Dr. Elliot Kitajima, na Esalq/USP. Na amostra foliar do isolado CdA_10 foram observadas partículas semelhantes a vírus (VLPs) (Figura 16) de aproximadamente 50 nm. Em plantas sintomáticas de tangelo Piemonte (CdA_13), tangerina (CdA_15), tangor Ortanique (CdA_16) e limão Fino (CdA_17) não foram observados possíveis vírions, mas consistentemente foi detectada a presença de material fibrilar no retículo endoplasmático (RE).

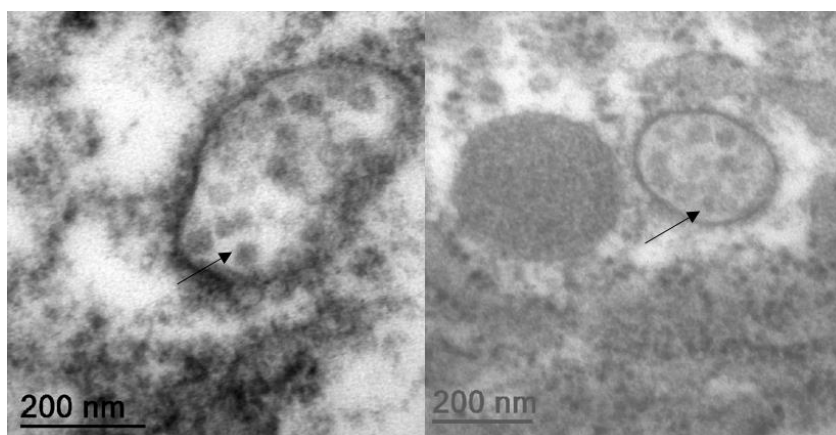


Figura 16: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de possíveis vírions em cortes ultrafinos de folhas de laranjeira Agridoce (*C. aurantium*) (CdA_10). Setas indicam as possíveis partículas virais de aprox. 50 nm. Fotos: E. W. Kitajima.

5.4 O kitavírus HGSV2 está presente em *Citrus* spp. no Brasil

5.4.1 O isolado DMs_01 de HGSV2 apresenta elevada identidade nucleotídica com o isolado HAI_1-1 do Havaí

A amostra foliar de *C. reticulata* de Domingos Martins, ES, coletada em 2017 (DMs_01) foi sequenciada mediante o uso da plataforma Illumina. O HTS dessa amostra gerou arquivos FastQ correspondentes às bibliotecas de mRNA com 15.196.586 reads (Tabela 7). Os *contigs* montados foram comparados usando BlastX contra sequências de fitovírus disponíveis no GenBank. Os *contigs* com sequências de kitavírus, *E-value* (≈ 0), foram identificados com códigos de acordo com a cidade de origem e a ordem cronológica da identificação dos isolados.

Da amostra DMs_01 foi possível recuperar três *contigs*, correspondentes com cada um dos segmentos do genoma de hibiscus green spot vírus 2 (HGSV2). As moléculas dos RNA1, RNA2 e RNA3 do isolado DMs_01 possuem 8384 nt, 3210 nt e 3184 nt, o que representa cobertura de 100% do genoma de HGSV2 isolado do Havaí (MELZER et al., 2013a), único higrevírus oficialmente descrito até o momento. Portanto, o genoma do isolado DMs_01 foi considerado o genoma de referência desse vírus no Brasil.

Os genomas dos isolado HAI_1-1 de e do isolado DMs_01 apresentam >94% de identidade de nucleotídeos (Tabela 7). DMs_01 possui uma ORF no RNA1, quatro no RNA2 e duas ORFs no RNA3, enquanto o isolado HAI_1-1 apresenta a mesma organização nos RNA1 e 2; mas, no RNA3, apresenta três ORFs, marcando uma diferença contrastante na organização genômica dos dois isolados (Figura 17).

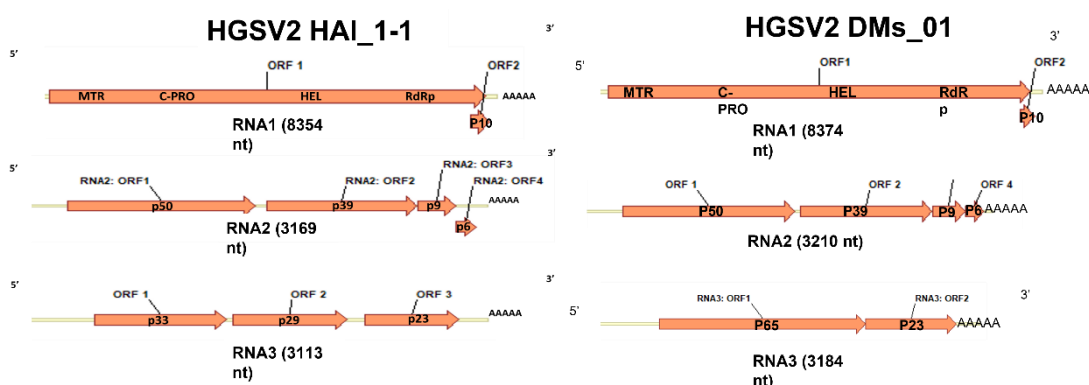


Figura 17: Organização genômica do HGSV2 isolado DMs_01 em comparação com a do isolado de referência HAI_1-1. O isolado brasileiro DMs_01 e o isolado do Havaí apresentam três RNAs poliadenilados. O RNA1 e o RNA2 dos isolados brasileiro e havaiano apresentam organização genômica idêntica, enquanto no RNA3 apresentam uma diferença no número de ORFs, sendo que o DMs_01 apresenta duas ORFs enquanto o HAI_1-1 apresenta três.

O RNA1 do HGSV2 isolado DMs_01 foi comparado com aqueles de outros membros aceitos e tentativos da família *Kitaviridae* (Tabela 7); entre eles os dos membros aceitos do gênero *Cilevirus*: citrus leprosis virus C (CiLV-C), citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2), passion fruit green spot virus (PfGSV) e hibiscus yellow blotch virus (HYBV), membros tentativos: Solanum violifolium ringspot virus (SvRSV), Ligustrum chlorotic spot virus (LigCSV) e Ligustrum leprosis virus (LigLV), vírus parcialmente caracterizados e que representam novos cilevírus e higrevírus: pistachio virus X (PisVX), pistachio virus Y (PisVY) (MOHAMMADI; RESOURCES; HOSSEINI, 2021), e vírus membros do gênero *Blunervirus*: blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), tea plant necrotic ring blotch virus (TPNRBV) e tomato fruit blotch virus (TFBV). A identidade de nucleotídeos entre o RNA1 do isolado do HGSV2 DMs_01 e o correspondente de outros kitavírus variou entre 44-97%. O RNA2 e RNA3 de HGSV2_DM não foram comparados com os dos outros kitavírus por apresentarem uma organização genômica não homóloga (Tabela 7).

Tabela 7: Identidade de nucleotídeos entre o isolado HGSV2 DMs_01 e membros aceitos e tentativos da família *Kitaviridae*.

HGSV2 DMs_01	RNA1 (%)	Nº acesso:	RNA2 (%)	Nº acesso:	RNA3 (%)	Nº acesso:
Gênero <i>Higrevirus</i>						
HGSV2_HAI_1-1	97.7	NC016141.1	95.0	NC016143.1	94.4	NC016142.1
PisVX	54.2	MT334620.1	51.5	MT334619.1	47.6	MT334618.1
Gênero <i>Cilevirus</i>						
CiLV-C	49.9	NC008169.1	-	-	-	-
CiLV-C2	49.2	NC038848.1	-	-	-	-
PfGSV	49.6	NC055653.1	-	-	-	-
HYBV	50.7	MT472637.1	-	-	-	-
PisVY	50.2	MT362606.1	-	-	-	-
SvRSV	49.8	OK626441.1	-	-	-	-
LigCSV	49.8	OK626447.1	-	-	-	-
LigLV	49.9	OK626451.1	-	-	-	--
Gênero <i>Blunervirus</i>						
BNRBV	45.9	NC016084.1	-	-	-	-
TPNRBV	46.4	NC040401.1	-	-	-	-
TFBV	44.7	MW594435.1	-	-	-	-

Do ponto de vista filogenético, com o uso da sequência de aminoácidos da proteína RdRp (ORF1, RNA1), o isolado de HGSV2 DMs_01 se agrupa com o HGSV2 HAI_1-1 no ramo correspondente ao gênero *Higrevirus* (Figura 18). Esse ramo se posiciona entre aqueles com o cilevírus HYBV e com o parcialmente caracterizado pistachio virus X (PisVX, que possui características de higrevírus) e o blunervírus blueberry necrotic ring blotch virus (Figura 18).



Figura 18: Filogenia dos vírus da família *Kitaviridae*. A árvore de máxima verossimilhança foi construída com seqüências da proteína RdRp deduzida e utilizando a família *Virgaviridae* como grupo externo. O isolado HGSV2 DMs_01, destacado em vermelho, foi obtido neste trabalho. O alinhamento de múltiplas seqüências foi feito a partir de 528 resíduos de aminoácidos que foram selecionados usando o *software* BMGE (CRISCUOLO; GRIBALDO, 2010). A árvore filogenética foi construída a partir do modelo LG+F+I+G4 (LE; GASCUEL, 2008). Os valores de suporte de *bootstrap* (1.000 repetições) de ramificações maiores que 60% estão indicados nos círculos cinza.

5.4.2 A organização gênica do RNA3 de HGSV2 do isolado DMs_01 é diferente da do isolado do Havai

A partir do sequenciamento e anotação genômica obtidos através de análises bioinformáticas foi notada uma diferença na ORF1 do RNA3 do HGSV2 entre o isolado brasileiro DMs_01 e o isolado HAI_1-1.

No isolado de HGSV2 HAI_1-1 a ORF1:RNA3 está localizada entre os nucleotídeos das posições 465 (ATG, códon de iniciação) e 1358 (TAA, códon de terminação), enquanto a ORF2 começa na posição 1404 e vai até a posição 2180 (Figura 19). No isolado DMs_01, os fragmentos que correspondem às ORFs 1 e 2 do isolado HAI_1-1 estão fusionados, ou seja, formam parte de uma única ORF, sem interrupção (Figura 19). Para fins das análises comparativas, a ORF1 e a ORF2 do RNA3 de HGSV2 HAI_1-1 foram concatenadas. A identidade de nucleotídeos entre os isolados DMs_01 e HAI_1-1 foi de 95.2% e a identidade de aminoácidos da proteína deduzida alcançou 95.8%.

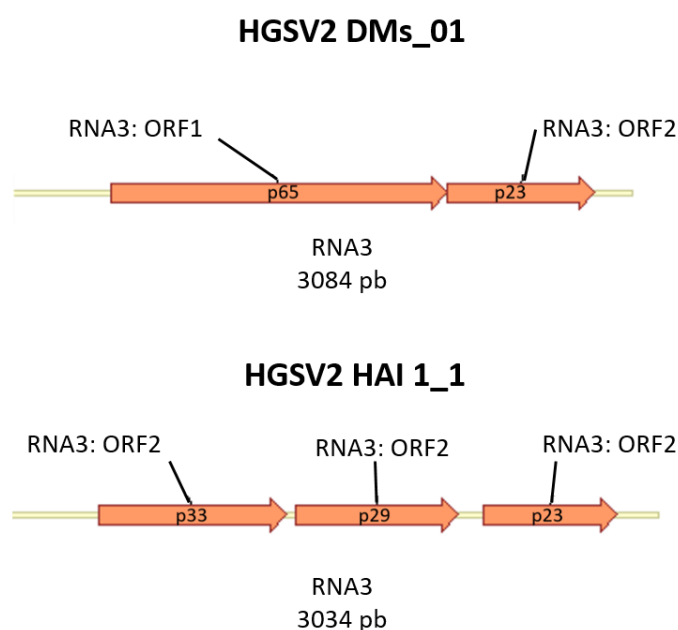


Figura 19: Organização do RNA3 do HGSV2 isolados do Brasil DMs_01 e do Havai HAI_1-1. O isolado brasileiro DMs_01 apresenta 3184 nt no RNA3 e duas ORFs codificando proteínas deduzidas de 65 e 23 kDa. O isolado do Havai HAI_1-1 apresenta 3134 nt no RNA3 e três ORFs codificando proteínas deduzidas de 33, 29 e 23 kDa.

As análises *in silico* da proteína P65 codificada pela ORF1 do RNA3 do isolado DMs_01 revelaram a presença de cinco domínios transmembranas: três no extremo COOH e dois na região NH₂ (Figura 20). Por outro lado, a P33 do HGSV2_HAI_1-1 possui três domínios transmembranas no extremo COOH, enquanto a P29 apresenta dois

domínios transmembranas no extremo NH₂ (Figura 20). As análises também revelaram a presença de possíveis peptídeos sinais na P65 do HGSV2 isolado DMs_01 e na P33 do HAI_1-1. Em ambos os casos, o valor da probabilidade da existência destes elementos foi entre 0,40-0,41, levemente inferior àquele mínimo estabelecido como padrão de referência do programa (0,59) (Figura 21). A P23 do HGSV2 DMs_01 apresentou motivos conservados para SP24 (PF16504, *Putative virion membrane protein of plant and insect virus*), na posição 60 a 193 aminoácidos (aa). A P23 do HGSV2 HAI_1-1, apresenta o mesmo domínio conservado (MELZER et al., 2013a), na posição 22 a 155 aminoácidos.

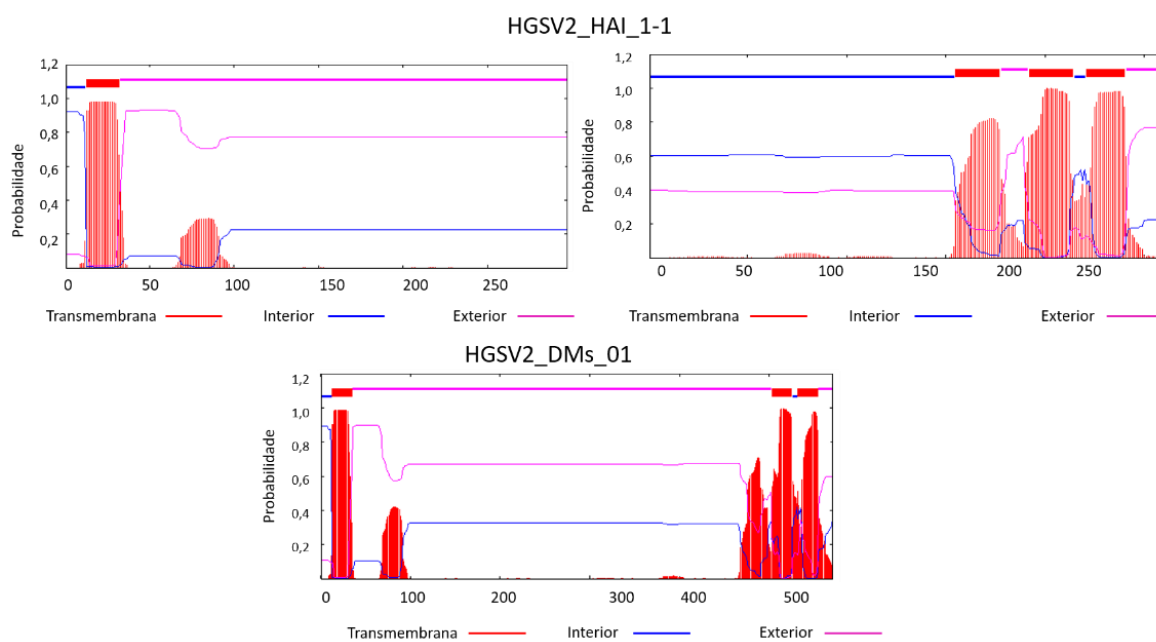


Figura 20: Predição de domínios transmembranas das proteínas P33, P29, e P65 dos isolados de HGSV2. P33 e P29, do HGSV2 HAI_1-1; P65 do isolado HGSV2 DMs_01, respectivamente. Gráficos gerados pelo software TMHMM 2.0.

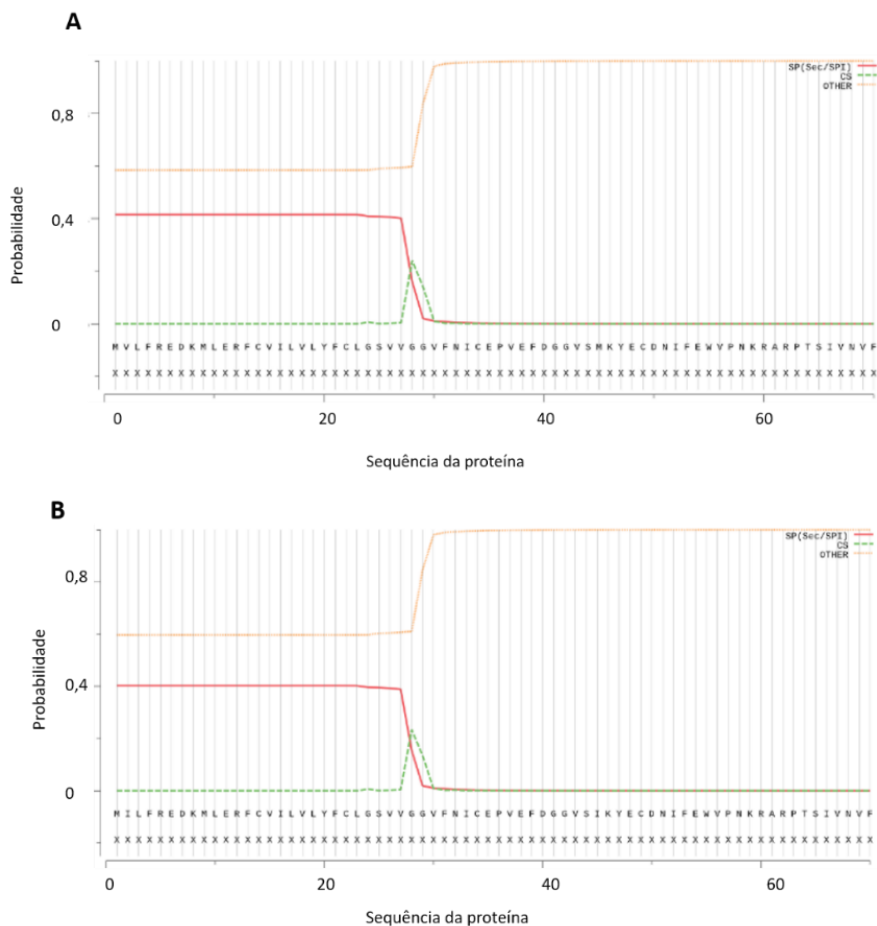


Figura 21: Gráficos de peptídeos sinais em isolados de HGSV2. A: Curvas de peptídeo sinal na P65 do isolado HGSV2 *DMs_01*. B: Curvas de peptídeo sinal da P33 de HGSV2 HAI_1-1. Gráficos gerados no software SignalP.

5.4.3 HGSV2 está presente em pelo menos três estados das regiões Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil

Através de RT-PCR com iniciadores específicos (Tabela 2) para o gene *RdRp* (MELZER et al., 2013a) foi possível detectar a presença do HGSV2 em 20 das 24 amostras cítricas sintomáticas, quatro delas provenientes do Espírito Santo, 15 provenientes da Bahia e duas de Santa Catarina. Das amostras positivas, 14 estão representadas na Figura 22.

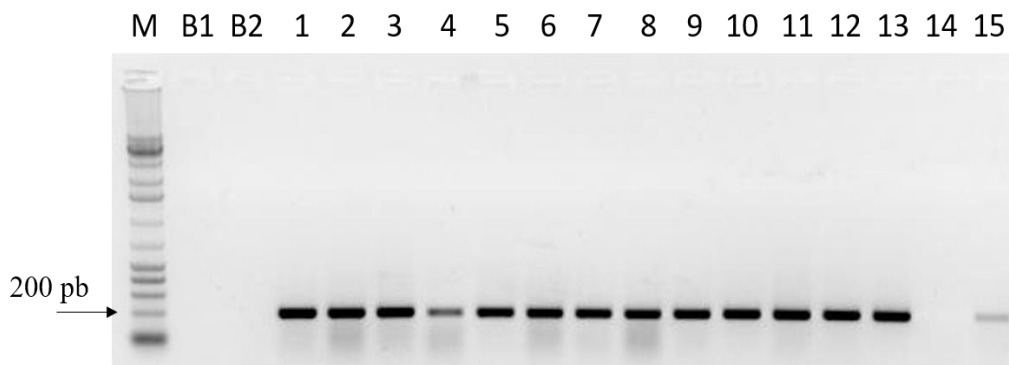


Figura 22: Gel de agarose a 1% para detecção de HGSV2 com os iniciadores para o gene *RdRp*. Tamanho do fragmento esperado: 198 pb. M: marcador molecular Promega 1 kb (Cat. G5711). B1: Branco de PCR, B2: Branco de cDNA. 1- *Citrus* sp., VNI_01. 2- *C. reticulata*, DMs_01. 3- *C. reticulata*, DMs_02. 4- *C. sinensis*, DM_03. 5: *C. sinensis*, CdA_03. 6: *C. deliciosa*, CdA_07. 7: *C. reticulata*, CdA_08. 8: *C. sinensis*, CdA_04. 9: *C. clementina*, CdA_09. 10- *C. aurantium*, CdA_10. 11: *C. sinensis*, CdA_12. 12: *C. sinensis* x *C. paradisi*, CdA_14. 13: *C. limon*, CdA_17. 14: *C. sinensis*, CdA_06. 15: *C. reticulata*, CdA_15.

A partir do genoma de HGSV2 do isolado DMs_01 caracterizado neste trabalho, foram sintetizados iniciadores para a detecção do vírus (Tabela 4). O par de iniciadores 5F e 4R, que amplifica 248 pb da região do *binary movement block* (BMB) do RNA2 de HGSV2 (Figura 23) e o par de iniciadores 4F e 3R, que amplifica 264 pb da região da P23 do RNA3 do HGSV2 (dados não mostrados), foram selecionados para a detecção do HGSV2. Esses iniciadores foram definidos como complementares ao par de iniciadores presente na literatura e podem auxiliar na caracterização e na detecção viral. No entanto, seu uso se recomenda como complemento ao método de detecção do HGSV2 disponível na literatura (MELZER et al., 2013a). Das 23 amostras avaliadas, 16 foram amplificadas com o par 5F e 4R do RNA2 (Figura 23).

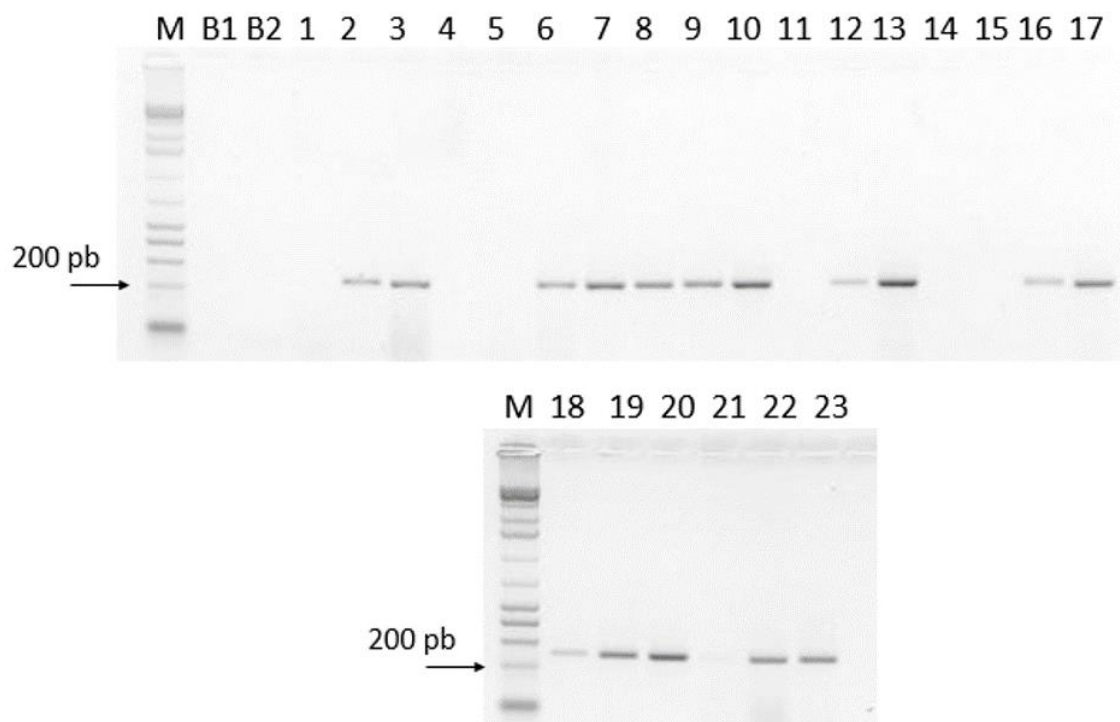


Figura 23: Gel de agarose a 1% para detecção de HGSV2 com os iniciadores desenhados para o gene *binary moviment block* (BMB) do RNA2. Tamanho do fragmento esperado: 248 pb. M: marcador molecular Cellco 1 Kb. B1: Branco de PCR, B2: Branco de cDNA. 1- *C. sinensis*, CdA_02. 2- *C. sinensis*, CdA_03. 3- *C. sinensis*, CdA_04. 4- *C. sinensis*, CdA_05. 5- *C. sinensis*, CdA_06. 6- *C. deliciosa*, CdA_07. 7- *C. reticulata*, CdA_08. 8- *C. clementina*, CdA_09. 9- *C. aurantium*, CdA_10. 10- *C. sinensis*, CdA_11. 11- *C. sinensis*, CdA_12. 12- *C. sinensis* x *C. paradisi*, CdA_13. 13- *C. sinensis* x *C. paradisi*, CdA_14. 14- *C. reticulata*, CdA_15. 15- *C. sinensis* x *C. reticulata*, CdA_16. 16- *C. limon*, CdA_17. 17- *C. sinensis*, CdA_18. 18- *C. sinensis* x *C. paradisi*, CdA_19. 19- *C. reticulata*, Itj_01. 20- *C. reticulata*, Itj_02. 21- *Citrus* sp., VNI_01. 22- *C. reticulata*, DMs_01. 23- *C. reticulata*, DMs_02.

5.4.4 Caracterização de outros isolados do HGSV2 no Brasil

Três amostras foliares coletadas no período de 2016 a 2017, CdA_01, DMs_01 e DMs_02, e cinco provenientes de tecidos herborizados coletadas no período de 1933 a 1965, Ubt_01, Cmp_01, SPa_01 e Itn_01 e Itn_02 foram sequenciadas individualmente pelas plataformas Illumina ou IonTorrent. O HTS de amostras coletadas entre 2016 e 2017 gerou arquivos FastQ correspondentes às bibliotecas de mRNA que continham entre 13 e 15 milhões de *reads* e os arquivos de amostras herborizadas de siRNA entre sete e nove milhões (Tabela 8).

Os *contigs* montados mediante técnicas bioinformáticas foram comparados usando BlastX contra sequências de vírus de plantas disponíveis no GenBank. Os *contigs* com melhores valores de *E-value* (≈ 0) foram identificados e aqueles com sequências de kitavírus foram identificados com códigos de acordo com a cidade de origem e a ordem cronológica da identificação dos isolados (Tabela 8).

Na amostra DMs_02 foi possível obter um *contig* para cada segmento do genoma viral de HGSV2. A molécula do RNA1 desse isolado possui 8375 nt, a de RNA2 3215 nt e do RNA3 3188 nt, o que representa o genoma de um outro isolado de HGSV2 (cobertura >98%) (Tabela 8). Da amostra de laranjeira CdA_01 foram recuperados cinco *contigs* virais com tamanhos que variaram entre 228-807 nt para o RNA1, dois *contigs* de tamanho entre 465-1118 nt para o RNA2 e um *contig* para o RNA3 de 1086 nt, o que representa um genoma parcial (cobertura >93%) (Tabela 8).

Genomas parciais também foram obtidos a partir das análises das amostras do herbário coletadas no século XX. Do isolado Utb_01 foi recuperado um *contig* para o RNA1 com 260 nt, três *contigs* para o RNA2, o maior com 1757 nt, mas nenhum *contig* correspondente ao RNA3 foi recuperado (Tabela 8). Do isolado SPa_01 foi obtido um *contig* com 237 nt pertencente ao RNA1, cinco *contigs* do RNA2, o maior com 594 nt, e nenhum *contig* para o RNA3 (Tabela 8). No isolado Itn_01 foram recuperados 11 *contigs* no RNA1, o maior com 463 nt, quatro *contigs* para o RNA2, o maior com 1673 nt e nenhum para o RNA3 (Tabela 8).

Os isolados Ubt_01, SPa_01 e Itn_01 tiveram o RNA extraído e purificado com o PureLink™ miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e não foi possível recuperar o RNA3 (Tabela 8). Para o isolado Cmp_01, também extraído por PureLink™, foi possível recuperar 11 *contigs* no RNA1, o maior com 1266 nt, um *contig* no RNA2 com 2858 nt e quatro para o RNA3, o maior com 1090 nt (Tabela 8). O isolado Itn_02, obtido da mesma amostra que o isolado Itn_01 teve seu RNA extraído por Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e purificado com RNAeasy® MinElute® (QIAGEN, Venlo, Holanda), sendo recuperados cinco *contigs* para o RNA1, o maior com 5050 nt, três para o RNA2, o maior com 1428, e dois para o RNA3, o maior com 1800 nt (Tabela 8). Os genomas dos isolados DMs_02, CdA_01, Cmp_01 e Itn_02 apresentam organização genômica idêntica ao do isolado DMs_01, com uma ORF no RNA1, quatro ORFs no RNA2 e duas ORFs no RNA3.

A ausência do RNA3 em três das cinco bibliotecas geradas pelo HTS das amostras herborizadas poderia estar relacionada com a menor eficiência do protocolo de extração PureLink™ em comparação com o protocolo Trizol. No caso da amostra Itn_02, na qual foi utilizada o protocolo de Trizol, foi possível a recuperação dos três segmentos de RNA do HGSV2 e com alta cobertura do genoma (>94%), enquanto a mesma amostra Itn_01 extraída com o protocolo PureLink™, teve baixa cobertura (0-52%) e não foi possível

recuperar o RNA3. Esses resultados, embora suscetíveis a melhorias, sugerem que a extração do RNA com TRIzol seguida da purificação com RNAeasy® MinElute® (QIAGEN, Venlo, Holanda) foi mais satisfatória. Além disso, os menores indicadores no caso do RNA3 podem ser consequência dos níveis de acumulação do RNA3 e da expressão dos genes codificados por esse segmento genômico.

Nas oito bibliotecas geradas não foi possível identificar *contigs* de outros vírus além do HGSV2. Essas análises sugerem que o HGSV2 é o agente causal responsável por causar sintomas cloróticos nas amostras de citros coletadas entre 2016 e 2017 e em amostras herborizadas de clorose zonada dos citros da década de 1930 e 1960.

Tabela 8: Quantidade e tamanho de *contigs* obtidos no sequenciamento de alto rendimento (HTS) do HGSV2.

Identificação de isolados	N° de reads totais por biblioteca	<i>Contigs</i>			Tamanho dos <i>contigs</i> (nt)			Cobertura do genoma (%)		
		RNA1	RNA2	RNA3	RNA1	RNA2	RNA3	RNA1	RNA2	RNA3
HGSV2_DMs_01	15.196.586	1	1	1	8.384	3.210	3.184	100	100	100
HGSV2_DMs_02	13.768.392	1	1	1	8.375	3.215	3.188	99	98	99
HGSV2_CdA_01	13.741.658	5	2	1	228-807	465-1118	1086	93	98	97
HGSV2_Ubt_01	9.477.677	1	3	0	260	369-1757	-	3	54	-
HGSV2_SPa_01	7.417.994	1	5	0	237	349-594	-	3	18	-
HGSV2_Itn_01	8.196.714	11	4	0	218-463	221-1673	-	5	52	-
HGSV2_Itn_02	9.477.677	5	3	2	484-5050	487-1428	1290-1800	94	99	100
HGSV2_Cmp_01	9.036.575	11	1	4	255-1266	2858	296-1090	15	91	34

As sequências dos isolados de HGSV2 DMs_02, CdA_01 e Itn_02 foram comparadas com a de referência DMs_01. As análises revelaram uma identidade de nucleotídeos entre 94 e 100% para o RNA1, de 87 a 99% para o RNA2 e de 90 a 99% para o RNA3 (Tabela 9).

Tabela 9: Comparação de identidade de nucleotídeos (nt) entre o isolado HGSV2_DMs_01 e outros isolados obtidos neste trabalho, DMs_02, CdA_01 e Itn_02.

HGSV2_DMs_01	HGSV2_DMs_02 (%)	HGSV2_CdA_01 (%)	HGSV2_Itn_02 (%)
RNA 1	100	94,9	94,4
RNA 2	99,9	87,5	95,2
RNA 3	99,9	92,1	90,4

As 20 amostras amplificadas com o par de iniciadores para o gene *RdRp* (MELZER et al., 2013a) utilizado na detecção do HGSV2 foram testadas por RT-PCR com outros três pares de iniciadores específicos para o RNA1, RNA2 e RNA3, respectivamente, com o intuito de selecionar uma amostra para amplificação completa do genoma. A amostra CdA_09 foi selecionada considerando a geração de bandas mais fortes no gel de agarose, o que pode sugerir uma maior carga viral. Todos os iniciadores funcionaram e foi possível amplificar os fragmentos do genoma completo de HGSV2 (Figura 24), com exceção do 5F-5Ra do extremo 3' do RNA2. Os fragmentos amplificados por PCR tinham entre 433-940 pb. O genoma completo do isolado CdA_09 foi sequenciado pelo método Sanger e apresentou <90% de identidade de nucleotídeos com o isolado DMs_01.

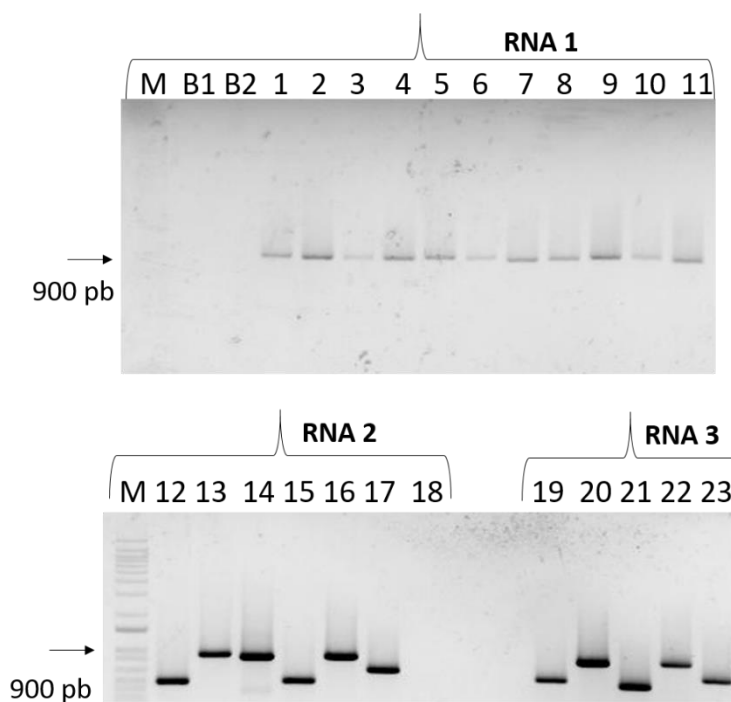


Figura 24: Gel de agarose a 1% evidenciando a amplificação do genoma completo de HGSV2 de amostra CdA_09 de *C. clementina* proveniente de Cruz das Almas, BA, coletada em 2016 por RT-PCR. M: marcador molecular Promega 1kb (Cat. G5711). **RNA 1:** B1. Branco de PCR, B2. Branco cDNA, 1. 1F - 1R, 2. 2F - 2R, 3. 3F - 3R, 4. 4F - 4R, 5. 5F - 5R, 6. 6F - 6R, 7. 7F - 7R, 8. 8F - 8R, 9. 9F - 9R, 11. 11F - 11R. **RNA 2:** 12. 1Fa - 1Ra, 13. 1F - 1R, 14. 2F - 2R, 15. 3Fa - 3Ra, 16. 3F - 3R, 17. 4F - 4R, 18. 5F - 5Ra. **RNA 3:** 19. 1Fa - 1Ra, 20. 1F - 1R, 21. 2F - 2Ra, 22. 3F - 3R, 23. 4F - 4Rc.

5.4.5 A organização do RNA3 do HGSV2 em todos os isolados brasileiros é idêntica

Nos isolados DMs_02, CdA_01 e Itn_02 foi possível recuperar o RNA3 do HGSV2 por meio de HTS e no isolado CdA_09 o RNA3 foi obtido por sequenciamento pelo método Sanger. A organização genômica desses isolados é idêntica à do isolado DMs_01, com duas ORFs que codificam as proteínas putativas P65 e P23. Em 15 isolados brasileiros, entre eles DMs_02 e CdA_09, a sequência da ORF1 do RNA3 foi avaliada por RT-PCR, utilizando os iniciadores 2F e 2Ra ou 2F e 2R (Tabela 4), os quais amplificam um fragmento de ~500 pb. Em sete amostras de *Citrus* spp. (VNI_01, CdA_08, CdA_09, DMs_03, CdA_03, CdA_11 e CdA_12) foi possível a amplificação do fragmento esperado de aproximadamente 540 pb da ORF1 (*p65*) (Figura 25). Os fragmentos amplificados da *p65* de HGSV2 de isolados brasileiros (CdA_03, CdA_11, VNI_01, CdA_12) foram sequenciados pelo método Sanger e as análises das sequências demonstraram de 92 a 97% de identidade de nucleotídeos com o isolado DMs_01, sem a presença do códon de terminação intermediário.

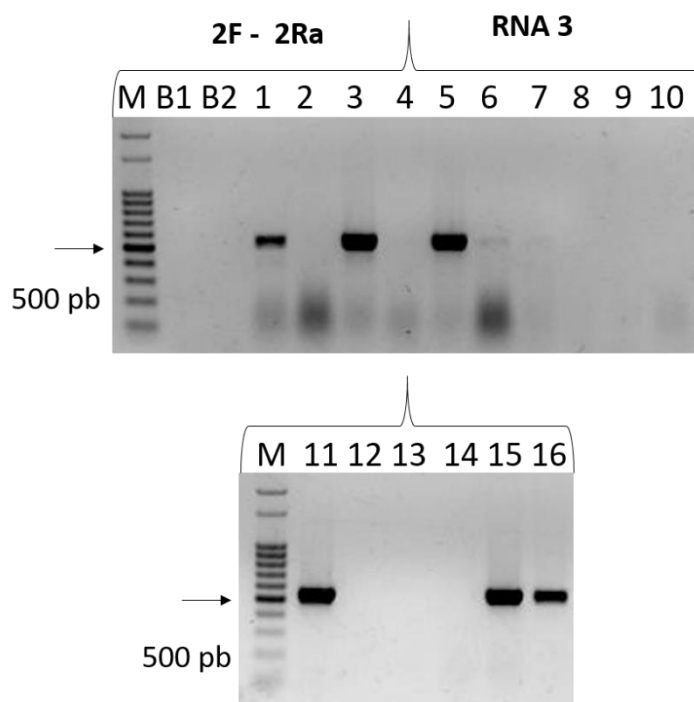


Figura 25: Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação de 540 pb da ORF *p65* do RNA3 de HGSV2 de amostras de *Citrus* spp. e *Arabidopsis thaliana* com os iniciadores desenhados 2F e 2Ra com 540 pb. M: marcador molecular Promega 1kb (Cat. G5711). B1- Branco de PCR. B2- Branco de cDNA. 1- *Citrus* sp. (VNI_01). 2- *C. deliciosa* (CdA_07). 3- *C. reticulata* (CdA_08). 4- *C. sinensis* (CdA_04). 5- *C. clementina* (CdA_09). 6- *C. sinensis* (DMs_03). 7- *C. sinensis* (CdA_03). 8- *C. aurantium* (CdA_10). 9- *C. aurantium* (CdA_10 a). 10- *C. aurantium* (CdA_10b). 11- *C. sinensis* (CdA_11). 12 - Tangelo Piemonte (*C. sinensis* x *C. paradisi*) (CdA_13). 13 - Tangelo Piemonte (*C. sinensis* x *C. paradisi*) (CdA_13 a). 14 - Tangelo Piemonte (*C. sinensis* x *C. paradisi*) (CdA_14). 15- *C. sinensis* (CdA_12). 16- Controle positivo, *C. reticulata* (DMs_01).

5.5 Ácaros *Brevipalpus yothersi* e *B. papayensis* transmitem o HGSV2

Cerca de oito ácaros secos foram encontrados nas plantas de *Citrus* spp. sintomáticas e infectadas com HGSV2 (CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_15, CdA_16 e CdA_17). As análises por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura permitiram identificar quatro ácaros adultos e duas ninfas como *B. papayensis* (Figura 25 A e C) e outros dois adultos foram identificados como *B. yothersi* (Figura 26 B e D).

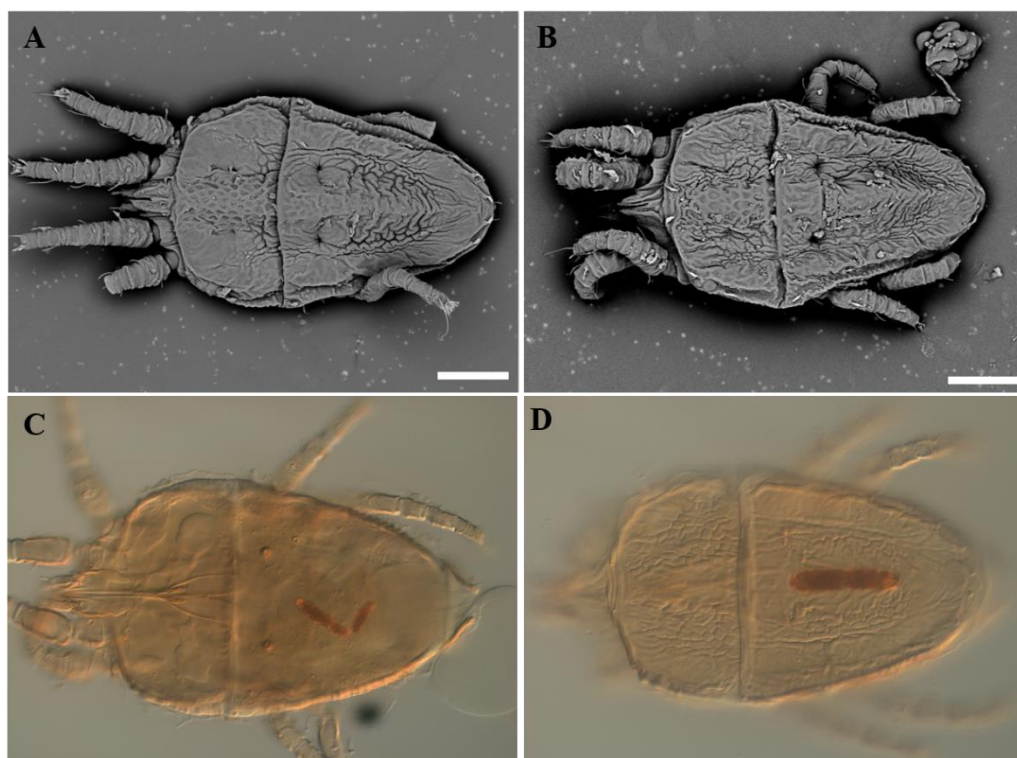


Figura 26: Micrografias de ácaros *Brevipalpus papayensis* e *B. yothersi* identificados em plantas de *Citrus* spp. coletadas em Cruz das Almas, BA, apresentando sintomas associados à clorose zonada. A e B: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura. A: *B. papayensis*. B: *B. yothersi*. C e D: Micrografias de microscopia de luz. C: *B. papayensis*. D: *B. yothersi*. Escala 50 μ m. Micrografias: A,D. Tassi.

Além dos ácaros secos, cerca de vinte ácaros vivos do gênero *Brevipalpus* supostamente virulíferos foram coletados de oito plantas de *Citrus* spp. dos isolados CdA_10, CdA_11, CdA_13, CdA_15, CdA_16, CdA_17, CdA_18 e CdA_19 e de 11 frutos de *C. reticulata* das fontes de inóculo Itj_01 e Itj_02 com sintomas causados por HGSV2. Estes ácaros foram utilizados para a tentativa de transmissão do HGSV2 a plantas de *A. thaliana*. Não foram identificadas as espécies de todos os ácaros utilizados para este experimento de transmissão, mas ovos de ácaros recolhidos após o experimento com as fontes da Bahia nas plantas de *A. thaliana* foram identificados como *B. papayensis*.

A coleta de quatorze folhas de quatro plantas de *A. thaliana*, At_01, At_02 e At_03, inoculadas com fontes da Bahia e At_04 de Santa Catarina, apresentando sintomas cloróticos/necróticos (Figura 27) e de folhas adjacentes foi realizada de 12 a 21 dias após a infestação com ácaros *Brevipalpus*, e conforme o aparecimento e evolução dos sintomas. Os sintomas cloróticos observados eram semelhantes àqueles associados com o amarelecimento natural das folhas. Os ácaros encontrados nas folhas coletadas foram transferidos para novas folhas das mesmas plantas com a possibilidade de transmitir o vírus para novas folhas não marcadas inicialmente. Nas folhas coletadas para análise por RT-PCR os ácaros e ovos foram removidos.

As folhas sintomáticas coletadas foram avaliadas com o intuito de detectar a presença de HGSV2 e os extratos de RNA foram submetidos a RT-PCR com iniciadores específicos para o gene *RdRp* de HGSV2 (Tabela 2). Com esses iniciadores foi possível amplificar o HGSV2 em duas folhas da AT_01, três folhas da At_2 e duas folhas da At_03 e estão representadas no gel de agarose (Figura 28, Tabela 10), demonstrando a transmissão experimental desse kitavírus por ácaros do gênero *Brevipalpus* (Figura 28). Folhas não sintomáticas das plantas de *A. thaliana* infestadas por ácaros virulíferos também foram avaliadas para a presença de HGSV2 por RT-PCR utilizando-se os três pares de iniciadores específicos previamente descritos. Os resultados foram negativos para a presença do vírus, enquanto o gene *NAD5*, controle interno da planta, foi amplificado (dados não mostrados).

Além dos experimentos de transmissão do HGSV2 com ácaros *Brevipalpus* spp. direto das fontes de inóculo da Bahia e de Santa Catarina, ensaios foram realizados com ácaros *Brevipalpus papayensis* e com duas populações de *B. yothersi* (populações A1 e A2). As folhas sintomáticas foram coletadas de 9 a 18 dias após a infestação (Figura 27). Para os ensaios com *B. papayensis* das fontes da Bahia foram utilizadas sete plantas de *A. thaliana*, tendo sido coletadas e analisadas 21 folhas por RT-PCR, em uma folha de cada planta (At_5, At_06, At_07 e At_11) foi possível detectar o HGSV2 e estão representadas no gel de agarose (Tabela 10, Figura 28). Para os ensaios com *B. papayensis* das fontes de Santa Catarina foram utilizadas duas plantas de *A. thaliana* e avaliadas cinco folhas por RT-PCR, destas, uma folha da At_12 foi positiva para HGSV2 (Tabela 10, Figura 28).

Para o ensaio com *B. yothersi* da população A2 com fontes da Bahia, foi usada uma folha de uma planta (At_37) que amplificou com iniciadores para HGSV2. Para o

experimento com *B. yothersi* da população A1 com fontes da Bahia, foram utilizadas 20 plantas de *A. thaliana* e 66 folhas foram coletadas e analisadas, dessas em duas folhas da At_16, em uma folha da At_21, em uma da At_36 e em duas da At_26 foi detectado o HGSV2, estão representadas no gel de agarose (Tabela 10, Figura 28). Esses ensaios confirmaram a transmissão do HGSV2 por *B. papayensis* e *B. yothersi*. Das 108 folhas avaliadas, 36 estão representadas na Figura 28.

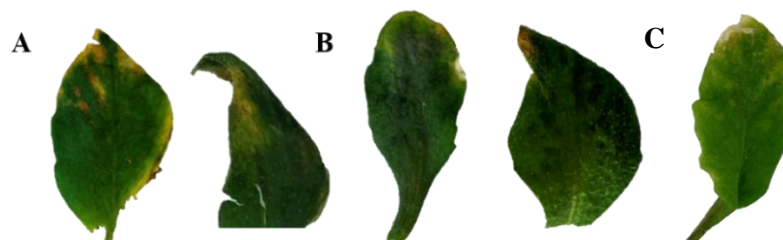


Figura 27: Folhas de *Arabidopsis thaliana* com sintomas causados por HGSV2 após transmissão com ácaros *Brevipalpus* sp. A: Folhas de *A. thaliana* (At_01) com HGSV2. B: Folha de *A. thaliana* (At_02) com HGSV2. C: Folha de *A. thaliana* (At_11) infestada com *B. papayensis* virulíferos para HGSV2.

Tabela 10: Ensaios de transmissão do HGSV2 por ácaros *Brevipalpus* para plantas de *A. thaliana*, evidenciando a origem das fontes de inóculo e os resultados obtidos após RT-PCR.

Experimento	Nº de plantas	Nº total de folhas/positivas	Ácaros	Origem do inóculo
I	3	12/7	<i>Brevipalpus</i> spp.	BA
II	1	2/0	<i>Brevipalpus</i> spp.	SC
III	7	21/4	<i>B. papayensis</i>	BA
IV	2	5/1	<i>B. papayensis</i>	SC
V	1	1/1	<i>B. yothersi</i> (A2)	BA
VI	20	66/9	<i>B. yothersi</i> (A1)	BA
VII	1	1/1	<i>B. yothersi</i> (A1)	SC

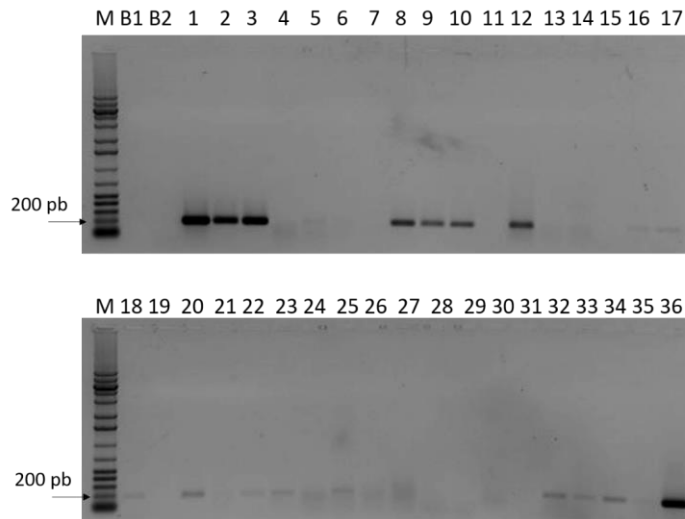


Figura 28: Gel de agarose a 1% de ensaios de RT-PCR evidenciando a transmissão do HGSV2 por ácaros *Brevipalpus* spp., *B. papayensis* e *B. yothersi*. B1: Branco de PCR. B2: Branco de cDNA. 1-10: Experimento I (*Brevipalpus* spp. da Bahia) 1-4: At_02, 5-8: At_03, 9-10: At_01. 11: Experimento II (*Brevipalpus* spp. de Santa Catarina), 11: At_4. 12-19: Experimento III (*B. papayensis*, fontes de inóculo da Bahia), 12-13: At_11, 14: At_14, 15-16: At_5, 17: At_06, 18: At_7, 19: At_10. 20 e 21: Experimento IV (*B. papayensis*, fontes de Santa Catarina), 20-21: At_12. 22: Experimento V (*B. yothersi* A2, fontes da Bahia), 22: At_37. 23-34: Experimento VI (*B. yothersi* A1, fontes da Bahia), 23: At_16, 24: At_26, 25: At_16, 26-27: At_15, 28: At_17, 29-30: At_21, 31: At_23, 32: At_21, 33-34: At_26. 35- Experimento VII (*B. yothersi* A1, fontes de Santa Catarina), 35: At_36. 36: Controle positivo de HGSV2 Itj_02.

A amostra de *A. thaliana* (At_11) positiva para HGSV2 teve o genoma completo amplificado por RT-PCR com os iniciadores desenhados neste trabalho, confirmando a transmissão por *B. papayensis* (Tabela 4, Figura 29). O sequenciamento pelo método Sanger apresentou >95% de identidade com o isolado HGSV2_DMs_01.

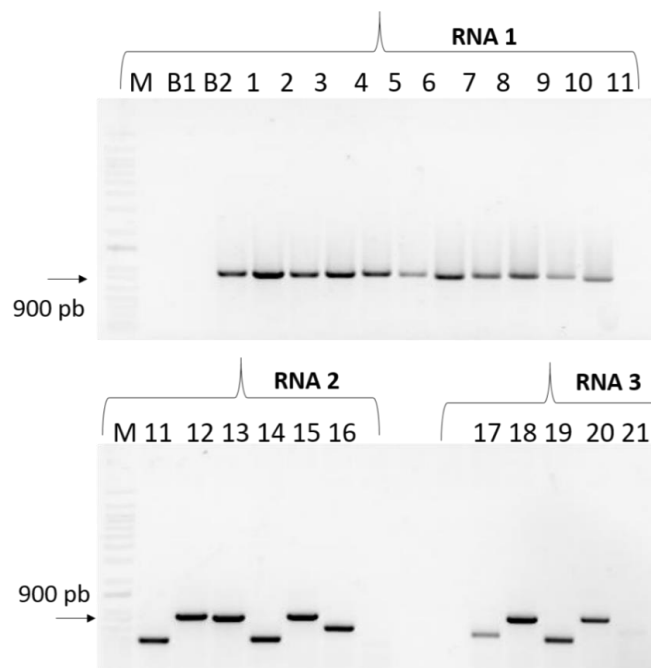


Figura 29: Gel de agarose a 1% evidenciando a amplificação do genoma completo de HGSV2 em *A. thaliana* (At_11) proveniente de experimento de transmissão mediado por *B. papayensis* por RT-PCR. M: marcador molecular Promega 1kb (Cat. G5711). RNA 1: B1- Branco de PCR, B2- Branco cDNA, fragmentos obtidos com os iniciadores 1. 1F - 1R, 2. 2F - 2R, 3. 3F - 3R, 4. 4F - 4R, 5. 5F - 5R, 6. 6F - 6R, 7. 7F - 7R, 8. 8F - 8R, 9. 9F - 9R, 10. 10F - 10R 11. 11F - 11R. RNA 2: 12. 1Fa - 1Ra, 13. 1F - 1R, 14. 2F - 2R, 15. 3Fa - 3Ra, 16. 3F - 3R, 17. 4F - 4R. RNA 3: 18. 1Fa - 1Ra, 19. 1F - 1R, 20. 2F - 2Ra, 21. 3F - 3R, 22. 4F - 4Rc.

5.6 Análises de microscopia eletrônica de transmissão demonstram alterações citopáticas nos tecidos de *A. thaliana* infectadas com HGSV2

Quinze fragmentos de folhas de nove plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas com HGSV2 dos experimentos de transmissão com *Brevipalpus* spp. foram submetidos a análises de MET pelo Dr. Elliot Kitajima, do Laboratório Professor Elliot Watanabe Kitajima, da Esalq/USP. Como resultado, na amostra At_21 foi possível observar um material fibrilar no retículo endoplasmático (Figura 30 I). Nas amostras At_15, At_16 e At_26 foi possível observar materiais tubulares difusos no lúmen do retículo endoplasmático com ca. 40-50 nm de comprimento variável (Figura 30 II). Em fragmentos de tecidos das *A. thaliana* At_15, At_16, At_21 e At_23 foi possível observar “bolsas” do cloroplasto com grupos de vesículas (ca. 100nm diam.) que englobam material particulado circular ou baciliforme (ca. 50 nm x 100 nm) (Figura 30 III). Tais estruturas não foram observadas em plantas cítricas infectadas com HGSV2. Nenhuma das alterações descritas foi observada em amostras de *A. thaliana* sadias.

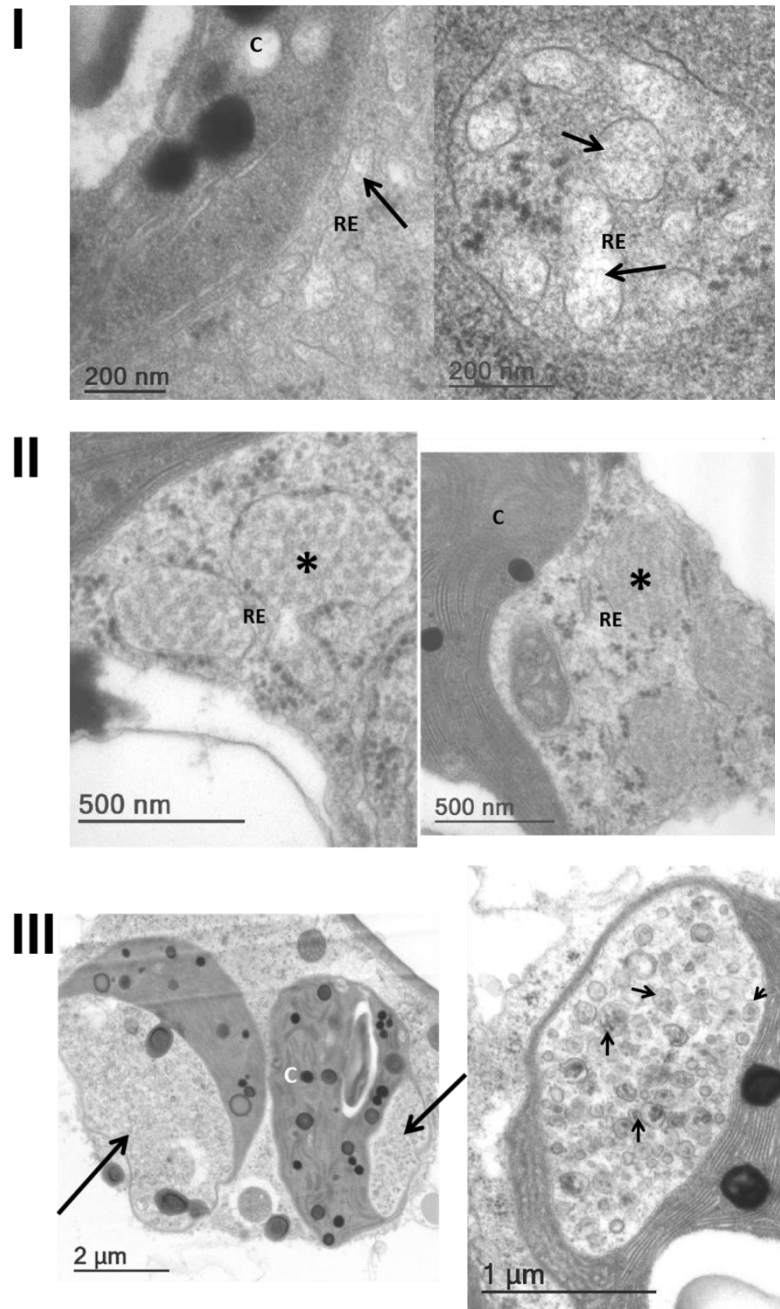


Figura 30: Micrografias de análises de microscopia eletrônica de transmissão de tecido foliar da *A. thaliana* infectadas com HGSV2 através de um experimento de transmissão com ácaros *Brevipalpus*. RE: Retículo endoplasmático. C: Cloroplasto. I: *A. thaliana* (At_21), as setas indicam os materiais fibrilares. II: At_15, * material tubular difuso. III: At_23, setas maiores indicam “bolsas” do cloroplasto; setas menores indicam vesículas, contidas nas bolsas que podem englobar partículas de HGSV2. Micrografias: E.W. Kitajima.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, através do HTS, sequenciamento pelo método Sanger e detecção por RT-PCR, foi possível confirmar pela primeira vez a presença do hibiscus green spot virus 2 (HGSV2) (gênero *Higrevirus*, família *Kitaviridae*) no Brasil e fora do Havaí. O sequenciamento de amostras herborizadas, coletadas na década de 1930 a 1960, permitiu confirmar a presença do HGSV2 em amostras em que foi descrita a clorose zonada dos citros (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a; ROSSETTI et al., 1965b, 1965a). O HGSV2 foi identificado e caracterizado molecularmente a partir de plantas de hibisco e citros no Havaí, EUA, em 2013, exibindo sintomas semelhantes aos de leprose e/ou clorose zonada dos citros (MELZER et al., 2013a). Com a detecção neste trabalho do higrevírus HGSV2, a presença de vírus dos três gêneros da família *Kitaviridae* foi confirmada no Brasil. Além do higrevírus, foram detectados membros do gênero *Cilevirus* que infectam citros, maracujá, plantas ornamentais, entre outras (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; LOCALI-FABRIS et al., 2006; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) e do gênero *Blunervirus*, o ToFBV, em tomates da região centro-oeste (NAKASU; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2022).

Os genomas dos isolados brasileiros de HGSV2 DMs_01, DMs_02, CdA_01 apresentam (+) ssRNA divididos em três segmentos e essencialmente uma organização similar à do isolado HAI_1-1. O RNA1 dos isolados brasileiros apresenta entre 7843-8374 nt em duas ORFs. O RNA2 tem entre 3150-3210 nt e possui quatro ORFs, enquanto o RNA3, com 3059-3184 nt, apresenta duas ORFs. Em comparação, os genomas dos isolados brasileiros de HGSV2 são similares ao do isolado do Havaí (HAI_1-1). Este exibe no RNA1 8354 nt e uma ORF, o RNA2 possui 3169 nt e quatro ORFs e o RNA3 tem 3113 nt e três ORFs (MELZER et al., 2013a). Assim, a organização do RNA3 marca uma diferença contrastante entre os genomas de HGSV2 dos isolados brasileiros e do Havaí.

A ORF1 do RNA3 dos isolados brasileiros tem tamanho semelhante à soma das ORFs 1 e 2 do Havaí. A ORF1:RNA3 dos isolados brasileiros codifica uma possível proteína de 65 kDa, enquanto as ORFs 1 e 2 do Havaí codificam possíveis proteínas de 33 kDa e 29 kDa, respectivamente (MELZER et al., 2013a). Os resultados sugerem que a P65 conserva, pelo menos em parte, as características estruturais presentes nas proteínas P33 e P29 de HGSV2 do isolado HAI_1-1. Em hipótese, essas análises indicam que a P65 do isolado brasileiro DMs_01 contém, em soma, a informação das proteínas P33 e

P29 do isolado de referência HAI-1-1, e que processos de fusão ou fissão envolvendo essas ORFs do RNA3, podem ser parte da história evolutiva do HGSV2. A presença da ORF *p65* do isolado DMs_01 foi detectada em outros 10 isolados brasileiros, que compartilham 93% de identidade de nucleotídeos, o que sugere que essa organização genômica é prevalente na linhagem brasileira de HGSV2.

O padrão de domínios transmembranas previsto na P65 do isolado de HGSV2 DMs_01 é semelhante aos domínios previstos para a P61 de CiLV-C. A P61 de CiLV-C apresenta domínios transmembranas previstos conservados entre vírus de insetos e membros do gênero *Cilevirus* (KUCHIBHATLA et al., 2014). A P65 também apresenta possíveis peptídeos sinais e esses resultados bioinformáticos podem sugerir que, como no caso da P61 dos cilevírus, a P65 também seja uma possível glicoproteína.

A doença clorose zonada dos citros (CZ) foi descrita no Brasil há 88 anos, ocasionando sintomas cloróticos em plantas do gênero *Citrus*. O agente causal foi associado a um vírus desconhecido devido à ausência de ferramentas de detecção eficazes na época (BITANCOURT, 1934; BITANCOURT; GRILLO, 1934). A estratégia de HTS da fração de siRNA utilizada para obter informações de viromas em amostras herborizadas tem sido efetiva em amostras de leprose (CHABI-JESUS et al., 2021; HARTUNG et al., 2015). As moléculas de siRNA, alvo do sequenciamento, são geradas através de um mecanismo natural de silenciamento gênico, e devido ao seu tamanho, são mais estáveis ao longo do tempo. O sequenciamento de amostras vegetais antigas tem permitido descobertas de vários vírus de plantas, sendo um dos casos mais excepcionais o desvendamento do genoma de um membro do gênero *Chrysovirus* obtido a partir de uma amostra de milho conservada por mais de 1000 anos (PEYAMBARI et al., 2019). Neste trabalho a mesma estratégia de HTS da fração de siRNA foi exitosamente usada para estudar o agente causal da CZ em amostras herborizadas. O HGSV2 encontrado na amostra herborizada Itn_02, coletada em SP, apresentou mais de 90% de identidade de nucleotídeos com o genoma do isolado DMs_01, também identificado neste trabalho. Este resultado evidencia que o higrevírus esteve presente em amostras cítricas no Brasil pelo menos desde a década de 1930 e que o HGSV2 é o agente causal da CZ.

O sequenciamento de uma mesma amostra obtida por dois métodos distintos de extração e purificação permitiu comparar os protocolos usados. A amostra Itn_02 que teve o RNA extraído e purificado pelos métodos de Trizol e Qiagen teve maior desempenho em relação a amostra Itn_01, que foi obtida pelo protocolo PureLink. O

melhor desempenho pode ser devido ao protocolo utilizado, pois o RNA extraído por Trizol fica mais tempo em contato com o reagente e o fenol presente retira impurezas do RNA total. O genoma do isolado Itn_02 apresentou 90% de cobertura do genoma e foi possível detectar a presença dos três RNAs de HGSV2, enquanto na amostra Itn_01 conseguiu-se entre 5 e 52% da informação nos RNAs 1 e 2, respectivamente, e não foi possível a recuperação do RNA3. Na amostra de Itn_02, a organização do RNA3 condiz com a identificada no isolado DM_01, o que demonstra que a presença da ORF *p65* é típica entre os isolados brasileiros de HGSV2. Tanto nas amostras herborizadas quanto nas amostras recentes mantidas a -80°C, foram identificadas apenas sequências de HGSV2, independentemente da estratégia de sequenciamento utilizada (sRNA ou mRNA com cauda poli A). Esse resultado não surpreende, uma vez que no sequenciamento de outros kitavírus que afetam citros também foi possível recuperar apenas os VTB de interesse (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020, 2022; CHABI-JESUS et al., 2021).

Os sintomas da CZ podem ser manchas cloróticas com bordas bem definidas, em formato de anéis, ou circulares em tons verdes claros, mas podem ser apenas manchas cloróticas acompanhando a nervura; raramente os sintomas são em galhos e a maioria é em folhas (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a; ROSSETTI et al., 1965b, 1965a). Esse padrão de sintomatologia também foi observado nas amostras de CZ coletadas entre 2016 e 2022 e descritas neste trabalho. Relatada há quase nove décadas no Brasil, foram poucos os relatos da CZ nos últimos 50 anos. No entanto, a partir de 2016 surgiram novos focos da doença em ao menos três estados brasileiros: Espírito Santo, em pequenas áreas de produção; Bahia, no BAG-Citros da Embrapa; e Santa Catarina, em pomares da Epagri. Colaboradores da Embrapa e da Epagri comentam, no entanto, que os sintomas são observados nessas áreas há décadas. A relativa baixa incidência da CZ pode ser consequência de uma subnotificação considerando que os seus sintomas poderiam ser confundidos ou mascarados com o amarelecimento de folhas típicos de deficiências nutricionais ou enfermidades de outras etiologias, por exemplo a leprose dos citros e o *huanglongbing* (HLB) ou *greening*. Unem-se a isto, o desconhecimento do agente causal da CZ e a ausência de ferramentas diagnósticas efetivas para a detecção desse vírus.

Os relatos da distribuição geográfica da CZ têm sido predominantes em regiões litorâneas. As primeiras descrições da doença foram nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (BITANCOURT, 1934b; BITANCOURT; GRILLO, 1934a). Os isolados de

Ubatuba – SP (Ubt_01) e Itanhaém – SP (Itn_01 e 02), coletados na década de 1930, foram sequenciados neste trabalho e foi confirmada a presença do HGSV2. Na década de 1960, a CZ foi relatada em pomares de Cruz das Almas - BA (ROSSETTI et al., 1965b), uma localidade também próxima ao mar, menos de 200 km. A doença foi encontrada na mesma cidade 53 anos depois em árvores do BAG-Citros mantido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. Outras amostras com CZ foram encontradas também na região litorânea de Itajaí – SC ou bem próximas ao mar, como em Venda Nova do Imigrante – ES e Domingos Martins – ES, após 2016. Os dados geográficos das amostras coletadas no Brasil, unido ao relato do Havaí, EUA, em 2013 (MELZER et al., 2013a), sugerem que a doença aconteça predominantemente em regiões ao nível do mar.

A restrição geográfica da doença poderia estar associada a algum efeito abiótico e/ou ambiental à limitação na transmissão do vírus em diferentes regiões. Um caso semelhante foi relatado com o reovírus southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) transmitido pela cigarrinha *Sogatella furcifera*. A infecção por esse vírus é restrita ao Sul da China e ao Norte do Vietnã, que são regiões com temperaturas mais elevadas, embora o vetor possa migrar para outras áreas. Estudos recentes evidenciam que altas temperaturas interferem na interação entre o SRBSDV e seu vetor, favorecendo a transmissão do vírus para suas hospedeiras vegetais (YU et al., 2021).

Além disso, um estudo por amostragem revelou que *B. yothersi* é a espécie mais encontrada em pomares de citros nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Tocantins e Pará, enquanto *B. papayensis* (aparentemente o vetor mais eficiente do HGSV2) é menos frequente em citros, tendo sido encontrado, naquele estudo, apenas em Minas Gerais (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015). Em laranjeiras no Brasil, *B. papayensis* é encontrado predominantemente em pomares não comerciais (TASSI, 2018) e pode transmitir experimentalmente o CiLV-C (NUNES et al., 2018). A transmissão de HGSV2 principalmente por *B. papayensis* pode ser um dos fatores que determinam a limitação do vírus. A restrição geográfica de uma doença em função da ausência de seu vetor em determinada área é frequente na natureza, e é relatada para os dichorhavirus CiLV-N e CiCSV, transmitidos por *B. phoenicis* e *B. aff. yothersi*, respectivamente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018). Finalmente, as populações de ácaros podem ter eficiências de transmissão diferentes, mesmo dentro de uma mesma espécie, como relatado na interação entre CiLV-C e *B. yothersi* (TASSI et al., 2021).

O HGSV2 havia sido relatado apenas em limão volkameriano (*C. volkameriana*) e *Hibiscus arnottianus* (MELZER et al., 2013a). O presente trabalho contribuiu para expandir o conhecimento sobre a gama de hospedeiros deste higrévirus. No Brasil, a sua gama de hospedeiras naturais inclui espécies cítricas, como as tangerinas Cravo, Batanga e Swatow (*C. reticulada*), Clementina (*C. clementina*), mexerica (*C. deliciosa*), laranja Agridoce (*C. aurantium*), laranja Flor e laranja Rubi (*C. sinensis*), limão Fino (*C. limon*) e limão Cravo (*C. limonia*); além de híbridos, como tangelo Piemonte (*C. sinensis* x *C. paradisi*) e uma hospedeira experimental, a *Arabidopsis thaliana*. Grande parte dessas plantas estão presentes no BAG-Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde não há presença de LC. No Brasil, limões e limas ácidas são considerados resistentes à LC (BASTIANEL et al., 2006). O VTB-N OFV-citros infecta diversas espécies cítricas, mas por enquanto só em pomares fora do Brasil, como na Colômbia, onde foi relatado em *C. paradisi*, *C. aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. aurantium*, *C. limetta*, *C. sinensis* e *C. limon* (ROY et al., 2015), e no México, em *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. reticulata* e *C. paradisi* (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; GARCÍA-ESCAMILLA et al., 2018). Considerando que o HGSV2, agente causal da CZ, é um vírus com uma gama de hospedeiras abrangente dentro dos citros, eventuais mudanças nos padrões epidemiológicos desse vírus e do seu vetor podem representar uma ameaça potencial para a citricultura no Brasil.

Nas amostras de citros recebidas em 2021/2022 com sintomas de CZ e positivas para o HGSV2 foram encontrados ácaros das espécies *B. yothersi* e *B. papayensis*. Esses resultados corroboram observações anteriores sobre a identidade de ácaros em plantas com HGSV2 em Oahu, Havaí, 2012 (MELZER et al., 2013a). Os espécimes encontrados em plantas de *Hibiscus arnottianus* no Havaí foram classificados como *B. yothersi* e *B. papayensis* (32 indivíduos no total) e os 11 presentes em *Citrus volkameriana* eram *B. papayensis* (TASSI, 2018). Neste trabalho, pela primeira vez, a transmissão do HGSV2 foi confirmada molecular e biologicamente através de experimentos de transmissão do higrévirus por ácaros *B. papayensis* e *B. yothersi* para plantas de *A. thaliana*. Portanto, o higrévirus HGSV2 pode ser considerado um VTB. O sequenciamento pelo método Sanger do genoma completo de HGSV2 em *A. thaliana* revelou mais de 94% de identidade de nucleotídeos com o isolado DMs_01. Nove folhas de *A. thaliana* infestadas com *B. yothersi* foram positivas para HGSV2 por RT-PCR. Os resultados sugerem que o HGSV2 no Brasil é transmitido por *B. papayensis* e *B. yothersi*.

O presente trabalho apresenta o primeiro relato de transmissão por ácaros *Brevipalpus* de um vírus fora do gênero *Cilevirus*, na família *Kitaviridae* (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021). A transmissão do blunervírus BNRBV pode estar associada à presença de ácaros eriofídeos do gênero *Calacarus* (BURKLE; OLMSTEAD; HARMON, 2012), enquanto acredita-se que ácaros *Aculops lycopersici* possam ser os vetores de ToFBV em tomate (NAKASU; NAGATA; INOUE-NAGATA, 2022). A comprovação da transmissão do HGSV2 por ácaros *Brevipalpus* neste trabalho é congruente com experimentos biológicos com *Brevipalpus phoenicis* s.l, considerados vetores da clorose zonada dos citros na década de 1960 (ROSSETTI et al., 1965a, 1965b; ROSSETTI; LASCA; NEGRETTI, 1969). A amostra herborizada de limão (SPa_01) é proveniente de um experimento de transmissão. Assim, a detecção de HGSV2 mediante HTS nessa amostra, confirma a transmissão do HGSV2 por ácaros *Brevipalpus*. Os critérios de classificação dos ácaros *Brevipalpus* têm sido revistos. O complexo *B. phoenicis* s.l. deu lugar a várias espécies, entre elas, *B. papayensis*, *B. yothersi* e outras cinco espécies (BEARD et al., 2015).

A infecção pela maioria dos kitavírus é não sistêmica (QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021). Neste trabalho usamos folhas saudáveis, ou regiões da folha com ausência de sintomas, de plantas de *Citrus* spp. e *A. thaliana* para demonstrar a ausência de HGSV2. Os resultados confirmaram dados anteriores que sugeriam que a infecção causada por HGSV2 fosse apenas localizada, possivelmente restrita às áreas na periferia da zona de alimentação do ácaro (MELZER et al., 2013a; ROSSETTI et al., 1965b).

Nas infecções com kitavírus, partículas baciliformes ou quase arredondadas são tipicamente observadas no citoplasma, em vesículas associadas ao retículo endoplasmático (RE) ou no lúmen do próprio RE, nas células infectadas (FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Em análises de MET da amostra de tecido foliar do isolado CdA_10 infectado com HGSV2 foram observadas vesículas contendo estruturas arredondadas de aproximadamente 50 nm de diâmetro, de identidade ainda desconhecida, mas que poderiam ser vírions de HGSV2. Estruturas com igual aparência, chamadas corpúsculos multivesiculares, são observadas em caso de estresse celular (MARTINI et al., 2020). No entanto, vesículas de características parecidas às observadas na amostra CdA_10 foram detectadas nos tecidos infectados com o kitavírus hibiscus yellow blotch virus e, nesse caso, as partículas no lúmen das vesículas foram identificadas como os possíveis vírions

(OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021). Em tecidos foliares de *A. thaliana* do experimento de transmissão por *B. yothersi* submetidos a MET foi possível observar em uma amostra fibras finas no retículo endoplasmático (RE) (Figura 30) e, em três amostras, um material tubular difuso no lúmen do RE (Figura 30). Essas alterações poderiam ser uma produção de materiais fibrilares e tubulares exacerbada e inespecífica causada pela infecção por HGSV2. Em cinco fragmentos de tecidos de quatro amostras foi possível observar “bolsas” no cloroplasto contendo vesículas que englobam partículas virais que poderiam ser presumíveis vírions do HGSV2 (Figura 30). As partículas observadas possuem semelhança com as de cilevírus, apresentando morfologia circular ou baciliforme de 50-100 nm. Essas “bolsas” tridimensionalmente poderiam ser depressões na superfície dos cloroplastos onde as vesículas se alojam, formando um ambiente conveniente ao higrevírus.

Os postulados de Koch enunciam 1) uma associação constante do patógeno em organismos afetados com a doença; 2) isolamento do patógeno e cultivo em cultura pura; 3) o patógeno é inoculado sobre um organismo sadio e causa a doença; 4) o patógeno é re-isolado do hospedeiro experimental e é o mesmo da hospedeira original (PRESCOTT; FELDMANN; SAFRONETZ, 2017). Neste trabalho temos aportados elementos que permitem reconhecer a associação do HGSV2 e da clorose zonada dos citros. A detecção do genoma viral foi realizada em amostras de sete espécies de *Citrus* spp., além de ter sido sugerida essa associação no primeiro relato de HGSV2 (MELZER et al., 2013a). O isolamento do HGSV2 em cultura pura não foi cumprido; no entanto, esse vírus foi inoculado por ácaros do gênero *Brevipalpus* na hospedeira experimental *A. thaliana* e ensaios de RT-PCR confirmaram a presença do patógeno. Além disso, na década de 1960 foi realizado um experimento de transmissão com *Citrus* spp. apresentando sintomas de CZ e ácaros *Brevipalpus* foram utilizados para inocular o agente causal da CZ em plantas sadias de citros (ROSSETTI et al., 1965b). O HTS realizado neste trabalho, da amostra SPa_01 proveniente do experimento da década de 1960, confirmou a presença do HGSV2, sendo o mesmo patógeno original e encontrado atualmente.

Neste estudo, a partir da detecção de HGSV2 no Brasil, foram revelados o agente causal da clorose zonada e o agente vetor desse higrevírus. Existem previsões de que doenças transmitidas por *Brevipalpus* se tornem mais relevantes nos próximos anos devido ao número cada vez mais limitado de acaricidas permitidos na citricultura, mas também pelo aumento de densidades populacionais do ácaro provavelmente favorecidas

pelas mudanças climáticas que incluem o incremento de temperatura e a redução de umidade (GHINI; BETTIOL; HAMADA, 2011; GOODIN; DOS REIS FIGUEIRA, 2019). Até o momento, o HGSV2 está distribuído em pelo menos três estados brasileiros, mas não está presente em grandes áreas comerciais, como o cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais. No entanto, o HGSV2 pode ser um potencial problema para a citricultura, visto que é transmitido por ao menos duas espécies de ácaros *Brevipalpus*.

7 CONCLUSÕES

- 1) A detecção do HGSV2 representa o primeiro relato deste vírus no Brasil e na América continental e revela que o HGSV2 é o agente causal da clorose zonada dos citros.
- 2) Os genomas dos isolados brasileiros de HGSV2 possuem mais de 94% de identidade nucleotídica com o isolado de referência do Havaí, mas seu RNA3 apresenta uma organização diferente.
- 3) A gama de hospedeiras dos isolados brasileiros de HGSV2 está constituída por sete espécies cítricas, um híbrido e uma hospedeira experimental. O HGSV2 é transmitido por ácaros *Brevipalpus papayensis* e *B. yothersi*.
- 4) Iniciadores desenhados para a detecção do genoma completo de HGSV2 podem contribuir para a caracterização deste vírus, incluindo o levantamento da incidência da clorose zonada, estudos de variabilidade e o acompanhamento epidemiológico da doença no campo.

8 REFERÊNCIAS

- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; SØNDERBY, C. K.; SØNDERBY, S. K.; NIELSEN, H.; WINTHER, O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 2017.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019.
- ANDREWS, S. **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]**.
- ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; FALK, B. W.; CASTEEL, CIL.; 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, n. August, p. 1–20, 2020.
- ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; 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 viruses. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 1, p. 85–89, fev. 2017.
- ARENA, G. D.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; NUNES, M. A.; RIBEIRO-ALVES, M.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. 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, n. NOVEMBER2016, p. 1–17, 2016.
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; PEVZNER, P. A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BASSANEZI, R. B. Manual de leprose dos Citros: medidas essenciais de controle. **Fundecitrus**, v. 3, p. 1–23, 2019.
- BASSANEZI, R. B.; CZERMAINSKI, A. B. C.; LARANJEIRA, F. F.; MOREIRA, A. S.; RIBEIRO, P. J.; KRAINSKI, E. T.; AMORIM, L. Spatial patterns of the Citrus leprosis virus and its associated mite vector in systems without intervention. **Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 85–93, 2019.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 211–220, set. 2006.
- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V. M.; KITAJIMA, E. W.; KUBO, K. S.; BASSANEZI, R. B.; MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: Centennial of an unusual mite–virus pathosystem. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 284–292, 2010a.
- BEARD, J. J.; OCHOA, R.; BRASWELL, W. E.; BAUCHAN, G. R. Brevipalpus phoenicis (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae)-a closer look. **Zootaxa**, v. 3944, n. 1, p. 1–67, 2015.
- BESTER, R.; COOK, G.; BREYTENBACH, J. H. J.; STEYN, C.; DE BRUYN, R.; MAREE, H. J. Towards the validation of high-throughput sequencing (HTS) for routine plant virus

diagnostics: measurement of variation linked to HTS detection of citrus viruses and viroids.

Virology Journal, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2021.

BITANCOURT, A. Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. **Arquivos do Inst. Biológico**, v. 5, p. 185–196, 1934a.

BITANCOURT, A. A. A clorose zonada no estado de S.Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 5, p. 247–249, 1934b.

BITANCOURT, A. A. As doenças de vírus dos Citros. **O Biológico**, v. 1, n. 8, p. 257–262, 1935a.

BITANCOURT, A. A.; GRILLO, H. V. S. A clorose zonada: Uma nova doença de citrus. **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 245–247, 1934a.

BOARI, A. J.; FREITA-ASTÚA, J.; FERREIRA, P. D. T. O.; NEDER, D. G.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; KITAJIMA, E. W. Purification and serology of the Coffee ringspot virus. **Summa phytopatológica**, v. 30, n. 4, p. 453–458, 2004.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BURKLE, C.; OLMSTEAD, J. M.; HARMON, P. F. A potential vector of Blueberry necrotic ring blotch virus and symptoms on various host genotypes. **The American Phytopathological Society**, p. 2015, 2012.

CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; POSTCLAM-BARRO, M.; FONTENELE, R. S.; HARAKAVA, R.; BASSANEZI, R. B.; MOREIRA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; VARSANI, A.; FREITAS-ASTÚA, J. Molecular Epidemiology of Citrus Leprosis Virus C: A New Viral Lineage and Phylodynamic of the Main Viral Subpopulations in the Americas. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 986, abr. 2021.

CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; TASSI, A. D.; GUERRA-PERAZA, O.; KITAJIMA, E. W.; HARAKAVA, R.; BESERRA, J. E. A.; SALAROLI, R. B.; FREITAS-ASTÚA, J. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease**, v. 102, n. 8, p. 1588–1598, 2018.

CHILDERS, C. C.; RODRIGUES, J. C.; RIVERA, C. A control strategy for breaking the virus-vector cycle of *Brevipalpus* spp. and the Rhabdovirus disease, citrus leprosis. **Manejo Integrado de Plagas**, n. 60, p. 76–79, 2001.

CHILDERS, C. C.; RODRIGUES, J. C. V.; WELBOURN, W. C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari:Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, n. 1–3, p. 29–105, 2003.

CITRUSBR. Estatísticas e exportacoes. 2022.

CIUFFO, M.; KINOTI, W. M.; TIBERINI, A.; FORGIA, M.; TOMASSOLI, L.; CONSTABLE, F. E.; TURINA, M. A new blunervirus infects tomato crops in Italy and Australia. **Archives of Virology**, v. 165, n. 10, p. 2379–2384, 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, n. 4, 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. n. April, p. 2–5, 2022.

CRISCUOLO, A.; GRIBALDO, S. BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. **BMC Evol. Biol.**, 2010.

CRUZ-JARAMILLO, J. L.; RUIZ-MEDRANO, R.; ROJAS-MORALES, L.; LÓPEZ-BUENFIL, J. A.; MORALES-GALVÁN, O.; CHAVARÍN-PALACIO, C.; RAMÍREZ-POOL, J. A.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2602–22, jul. 2014.

DE LILLO, E.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; SIMONI, S.; TASSI, A. D.; VALENZANO, D. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, n. 5, p. 439–462, 29 out. 2021.

Disponível em:

<http://www.schweizerbart.de/papers/entomologia/detail/41/100302/Phytophagous_mites_transmitting_plant_viruses_updade?af=crossref>. Acesso em: 20 out. 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**, 26 jul. 2018.

EMBRAPA. **Doenças de citros**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/mandioca-e-fruticultura/cultivos/citros>>.

FAWCETT, H. S. **Scaly bark or nail-head rust of citrus**. **Bulletin. Florida Agricultural Experiment Station** University of Florida, Agricultural Experiment Stations], 1911.

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

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, dez. 2018.

FRUTA, R. da. **Projeto meios mapeia producao de limao no brasil em 2019**. Disponível em: <<https://www.revistadafruta.com.br/eventos/projeto-meios-mapeia-producao-de-limao-no-brasil-em-2019,402794.jhtml>>.

FUNDECITROS. **REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2021/22 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO – FECHAMENTO EM ABRIL/2021**. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0422__Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf>.

FUNDECITROS. **A leprose do citros**. Disponível em:

<<https://www.fundecitrus.com.br/doencas/leprose>>.

GARCÍA-ESCAMILLA, P.; DURAN-TRUJILLO, Y.; OTERO-COLINA, G.; VALDOVINOS-PONCE, G.; SANTILLÁN-GALICIA, M. T.; ORTIZ-GARCÍA, C. F.; VELÁZQUEZ-MONREAL, J. J.; SÁNCHEZ-SOTO, S. Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 69–77, 2018.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; HAMADA, E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: Current knowledge and perspectives. **Plant Pathology**, v. 60, n. 1, p. 122–132, 2011.

GOODIN, M.; DOS REIS FIGUEIRA, A. Good to the last drop: The emergence of coffee ringspot virus. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2019.

GU, W.; MILLER, S.; CHIU, C. Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. October 2018, p. 319–338, 2019a.

HAO, X.; ZHANG, W.; ZHAO, F.; LIU, Y.; QIAN, W.; WANG, Y.; WANG, L.; ZENG, J.; YANG, Y.; WANG, X. Discovery of plant viruses from tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by metagenomic sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–15, 2018.

HARTUNG, J.; ROY, A.; FU, S.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W. L.; BRLANSKY, R. H. History and diversity of citrus leprosis virus recorded in herbarium specimens. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1277–84, set. 2015.

HATCHER, E. L.; ZHDANOV, S. A.; BAO, Y.; BLINKOVA, O.; NAWROCKI, E. P.; OSTAPCHUCK, Y.; SCHAFFER, A. A.; RODNEY BRISTER, J. Virus Variation Resource-improved response to emergent viral outbreaks. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D482–D490, 1 jan. 2017.

IBGE. **Produção agrícola - Lavoura Permanente**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/12046>>.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequences alignment software version 7: improvements in performances and usability. **Mol. Biol. Evol.** v.30, p. 772-780, 2013.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, jun. 2012.

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, n. 1–3, p. 135–160, 2003.

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

KITAJIMA, E. W.; NOME, C. F. **Microscopia eletrônica em virologia vegetal Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. [s.l.: s.n.]59–87 p.

- KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, J. C. V.; FREITAS-ASTUA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 348–371, 2010.
- KITAJIMA, E. W.; YUKIO, E.; NAKASU, T.; INOUE-NAGATA, A. K.; SALAROLI, R. B.; RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; ALBERTO, J.; REZENDE, M. Tomato fruit blotch virus cytopathology strengthens evolutionary links between plant blunerviruses and insect negevirus. **Scientia Agricola**, v. 80, p. 2023, 2022.
- KNORR, L. C. Studies on the Etiology of Leprosis in Citrus. In: Proc. 4th Conf. Int. Organ. Citrus. Virol., 1968, Gainesville Fla. [...]. Gainesville Fla: University of Florida Press, 1968. p. 332–341.
- KONDO, H.; FUJITA, M.; HISANO, H.; HYODO, K.; ANDIKA, I. B.; SUZUKI, N. Virome Analysis of Aphid Populations That Infest the Barley Field: The Discovery of Two Novel Groups of Nege/Kita-Like Viruses and Other Novel RNA Viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–19, 2020.
- KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M.; VARSANI, A.; WOLF, Y. I.; YUTIN, N.; ZERBINI, F. M.; KUHN, J. H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, p. 1–33, 2020.
- KUBO, K. S.; STUART, R. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. Evaluation of the genetic variability of orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the nucleocapsid gene. **Archives of Virology**, v. 154, n. 6, p. 1009–1014, 2009.
- KUCHIBHATLA, D. B.; SHERMAN, W. A.; CHUNG, B. Y. W.; COOK, S.; SCHNEIDER, G.; EISENHABER, B.; KARLIN, D. G. Powerful Sequence Similarity Search Methods and In-Depth Manual Analyses Can Identify Remote Homologs in Many Apparently “Orphan” Viral Proteins. **Journal of Virology**, v. 88, n. 1, p. 10–20, 2014a.
- LAZAREVA, E. A.; LEZZHOV, A. A.; KOMAROVA, T. V.; MOROZOV, S. Y.; HEINLEIN, M.; SOLOVYEV, A. G. **A novel block of plant virus movement genesMolecular Plant Pathology**2017.
- LE, S. Q.; GASCUEL, O. An improved general amino acid replacement matrix. **Mol. Biol.Evol.**, v. 10, p. 1307–1320, 2008.
- LEASTRO, M. O.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; PALLAS, V.; SANCHÉZ-NAVARRO, J. Unravelling the involvement of the cilevirus p32 protein on the viral transport. **Scientific Reports**, 2021.
- 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, n. September, p. 1299, set. 2018.
- LEE, S.; CHANG, Y. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. **Plant Pathology**, n. 26, p. 187–196, 2006.
- LEMOINE, F.; CORREIA, D.; LEFORT, V.; DOPPELT-AZEROUAL, O.; MAREUIL, F.; COHEN-BOULAKIA, S.; et al. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. **Nucleic Acids Res.** n. 47, W260-W265, 2019.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Res.** n. 49, W293-W296, 2021.

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. N.; MACHADO, M. A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis virus cytoplasmic type. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 9, p. 2721–9, set. 2006.

MARTINI, V. C.; MOREIRA, A. S. F. P.; FUZARO, L.; GONÇALVES, L. A.; DE OLIVEIRA, D. C. Pseudophacopteron longicaudatum (Hemiptera) induces intralaminar leaf galls on *Aspidosperma tomentosum* (apocynaceae): A qualitative and quantitative structural overview. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, p. 1–16, 2020.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. 929 p.

MELZER, M. J.; SETHER, D. M.; BORTH, W. B.; HU, J. S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, v. 102, n. 1, p. 122–127, 2013a.

MELZER, M. J.; SIMBAJON, N.; CARILLO, J.; BORTH, W. B.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; NEUPANE, K. R.; HU, J. S. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Archives of Virology**, v. 158, n. 11, p. 2421–2424, 4 jun. 2013b.

MESA, N. C.; OCHOA, R.; WELBOURN, W. C.; EVANS, G. A.; DE MORAES, G. J. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the World with a key to genera. **Zootaxa**, v. 2098, p. 1–285, 2009.

NAKASU, E. Y. T.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A. First report of tomato fruit blotch virus infecting tomatoes in Brazil. **Plant Disease**, p. 402–404, 2022.

NASCIMENTO, D. A.; EVANGELISTA, I. S.; NASCIMENTO, D. M. **A produção de tangerinas no cenário nacional**. Disponível em: <<https://revistacampoenegocios.com.br/a-producao-de-tangerinas-no-cenario-nacional/>>.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. Anuário da Citricultura 2017. **2017**, p. 60, 2017.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MARQUES, V. N.; MARTINEZ, L. F. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 166–174, 2020.

NUNES, M. A.; DE CARVALHO MINEIRO, J. L.; ROGERO, L. A.; FERREIRA, L. M.; TASSI, A. D.; NOVELLI, V. M.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTUA, J. First report of *Brevipalpus papayensis* Baker (Acari: Tenuipalpidae) as vector of Coffee ringspot virus and Citrus leprosis virus C. **Plant Disease**, 28 nov. 2018a.

OLMEDO-VELARDE, A.; HU, J.; MELZER, M. J. A Virus Infecting Hibiscus rosa-sinensis Represents an Evolutionary Link Between Cileviruses and Higreviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. May, p. 1–13, maio 2021.

OLMEDO-VELARDE, A.; ROY, A.; LARREA-SARMIENTO, A.; WANG, X.; PADMANABHAN, C.; NUNZIATA, S.; NAKHLA, MARK, K.; HU, J. S.; MELZER, M. J. First report of the hibiscus strain of citrus leprosis virus c2 infecting passionfruit (*Passiflora edulis*). **Plant Disease**, 2022.

OLMEDO-VELARDE, A.; ROY, A.; PADMANABHAN, C.; NUNZIATA, S.; NAKHLA, MARK, K.; MELZER, M. J. First Report of Orchid Fleck Virus Associated with Citrus Leprosis Symptoms in Rough Lemon (*Citrus jambhiri*) and Mandarin (*C. reticulata*) the United States. **Plant Disease**, 2021.

PANTALEO, V.; MASUTA, C.; SHIMURA, H. Plant Antiviral Defense: Gene-Silencing Pathways. **Encyclopedia of Virology**, p. 43–51, 1 jan. 2021.

PASCON, R. C.; KITAJIMA, J. P.; BRETON, M. C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A. S.; OKURA, V. K.; ALEGRIA, M. C.; CAMARGO, M. E.; SILVA, G. G. C.; CARDOZO, J. C.; VALLIM, M. A.; FRANCO, S. F.; SILVA, V. H.; JORDÃO, H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P. F.; FERRARI, F.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; FRANCHISCINI, F. J. B.; SILVA, J. M. F.; ARRUDA, P.; FERRO, J. A.; REINACH, F.; DA SILVA, A. C. R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of citrus leprosis associated virus, cytoplasmatic type (CiLV-C). **Virus Genes**, v. 32, n. 3, p. 289–298, 2006.

PEYAMBARI, M.; WARNER, S.; STOLER, N.; RAINER, D.; ROOSSINCK, J. A 1,000-Year-Old RNA Virus. **Journal of Virology**, v. 93, n. 1, p. 1–11, 2019.

PRESCOTT, J.; FELDMANN, H.; SAFRONETZ, D. Amending Koch's postulates for viral disease: When "growth in pure culture" leads to a loss of virulence. **Antiviral Research**, v. 137, p. 1–5, 2017.

QUITO-AVILA, D. F.; BRANNEN, P. M.; CLINE, W. O.; HARMON, P. F.; MARTIN, R. R. Genetic characterization of Blueberry necrotic ring blotch virus, a novel RNA virus with unique genetic features. **Journal of General Virology**, v. 94, n. PART 6, p. 1426–1434, 2013.

QUITO-AVILA, D. F.; FREITAS-ASTÚA, J.; MELZER, M. J. Bluner-, Cile-, and Higreviruses (Kitaviridae). **Encyclopedia of Virology**, p. 247–251, 2021.

RAMALHO, T. O.; FIGUEIRA, A. R.; SOTERO, A. J.; WANG, R.; GERALDINO DUARTE, P. S.; FARMAN, M.; GOODIN, M. M. Characterization of Coffee ringspot virus-Lavras: A model for an emerging threat to coffee production and quality. **Virology**, v. 464–465, n. 1, p. 385–396, 2014.

RAMALHO, T. O.; FIGUEIRA, A. R.; WANG, R.; JONES, O.; HARRIS, L. E.; GOODIN, M. M. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. **Archives of Virology**, v. 161, n. 2, p. 335–343, 2016.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; CHABI-JESUS, C.; ARENA, G. D.; TASSI, AD.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis: a unique multietiological disease. **Cítricos en las Américas (RIAC)**, p. 1–9, 2018a.

RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; CHABI-JESUS, C.; BANGUELA-CASTILLO, A.; TASSI, A. D. A. D.; RODRIGUES, M. da C.; KITAJIMA, E. W. 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, n. 9, p. 2519–2524, 2018b.

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, n. 6, p. 153, 6 jan. 2016a.

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

- ASTÚA, J. Citrus leprosis virus N: A new dichorhavirus causing Citrus leprosis disease. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 963–976, maio 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, n. 836076, p. 836076, 2022a. Acesso em: 28 mar. 2022.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L.; PONS, T.; CHABI-JESUS, C.; ARENA, G. D.; FREITAS-ASTÚA, J. Poorly conserved P15 proteins of cileviruses retain elements of common ancestry and putative functionality: a theoretical evaluation on the evolution of the cilevirus genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 0, n. November, p. 2542, 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 5'-End of the RNA2 Segment Across Cileviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–16, fev. 2020.
- RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.; FADEL, A. L.; NICOLINI, F.; NOVELLI, V. M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja**, v. 28, n. 12, p. 29–38, 2007.
- ROSSETTI, V.; LASCA, C. C.; NEGRETTI, S. New developments regarding leprosis and zonate chlorosis of citrus. **Proceedings First International Citrus Symposium**, v. 3, p. 1453–1456, 1969.
- ROSSETTI, V.; NAKADAIRA, J. T.; CALZA, R.; BONFANTI DE MIRANDA, C. A. A propagação da clorose zonada dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **O Biológico**, v. 31, p. 113–116, 1965a.
- ROSSETTI, V.; NAKADAIRA, J. T.; CALZA, R.; MIRANDA, C. A. B. Estudos sobre a clorose zonada dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 32, n. 3, p. 111–125, 1965b.
- 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, n. 5, p. 488–500, 2013.
- ROY, A.; LEON, M. G.; STONE, A. L.; SCHNEIDER, W. L.; HARTUNG, J.; BRLANSKY, R. H. First Report of Citrus Leprosis Virus Nuclear Type in Sweet Orange in Colombia. **Plant Disease**, v. 98, n. 8, p. 1162, 28 mar. 2014.
- ROY, A.; STONE, A. L.; MELZER, M. J.; SHAO, J.; HARTUNG, J. S.; MAVRODIEVA, V.; NAKHLA, M. K.; BRLANSKY, R. H.; SCHNEIDER, W. L. Complete nucleotide sequence of a novel hibiscus-infecting cilevirus from Florida and its relationship with closely associated cileviruses. **Genome Announcements**, v. 6, n. 4, p. 1–2, 25 jan. 2018.
- ROY, A.; STONE, A. L.; SHAO, J.; OTERO-COLINA, G.; WEI, G.; CHOUDHARY, N.; ACHOR, D.; LEVY, L.; NAKHLA, M. K.; HARTUNG, J. S.; SCHNEIDER, W. L.; BRLANSKY, R. H. Identification and Molecular Characterization of Nuclear Citrus Leprosis Virus, a Member of the Proposed Dichorhavirus Genus Infecting Multiple Citrus Species in Mexico. **Phytopathology**, v. 105, n. 4, p. 564–75, 14 abr. 2015.
- SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, E. J.; SANTILLÁN-GALICIA, M. T.; NOVELLI, V. M.; NUNES, M. A.; MORA-AGUILERA, G.; VALDEZ-CARRASCO, J. M.; OTERO-COLINA, G.;

FREITAS-ASTÚA, J. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133861, jan. 2015.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311–313, jul. 2006.

SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F.; MIRANDA, M. P. de; BASSANEZI, R. B.; ANDRADE, D. J. Guia de Controle de Pragas e Doenças de Citros. **Fundecitrus**, 2022.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**, v. 6, p. 175–182, 1998.

TASSI, A. D. Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari : Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus. **Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ,”** 2018.

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, n. 3, p. 227–241, mar. 2017.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. -T.; VON HAESLER, A.; MINH, B. Q. W-IQ- TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Res.** n. 44, W232-W235, 2016.

VASILAKIS, Nikos.; FORRESTER, NAOMI, L.; PALACIOS, Gustavo.; NASAR, Farooq.; SAVJI, Nazir.; ROSSI, SHANNAN, L.; GUZMAN, Hilda.; WOOD, THOMAS, G.; POPOV, Vsevolod.; GORCHAKOV, Rodion.; GONZÁLEZ, A. Vázquez.; HADDOW, ANDREW, D.; WATTS, DOUGLAS, M.; ROSA, AMELIA, P. A. Travassos.; WEAVER, SCOTT, C.; LIPKIN, W. Ian.; TESH, R. B. Negevirus: a Proposed New Taxon of Insect-Specific Viruses with Wide Geographic Distribution. **Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p. 2475–2488, 2013.

WEEKS, A. R.; MAREC, F.; BREEUWER, J. A. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5526, p. 2479–82, 29 jun. 2001.

YU, X.; JIA, D.; WANG, Z.; LI, G.; CHEN, M.; LIANG, Q.; ZHOU, Y.; LIUID, H.; XIAO, M.; LI, S.; CHEN, Q.; CHEN, H.; WEIL, T. **A plant reovirus hijacks endoplasmic reticulum-associated degradation machinery to promote efficient viral transmission by its planthopper vector under high temperature conditions** **PLoS Pathogens** 2021.