



**CARGA VIRAL DAS ESTIRPES DE CITRUS LEPROSIS
VIRUS C E SEU POTENCIAL IMPACTO NA
EPIDEMIOLOGIA DA LEPROSE DOS CITROS**

MATHEUS POTSCLAM BARRO

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

**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**

**CARGA VIRAL DAS ESTIRPES DE CITRUS LEPROSIS VIRUS C E SEU
POTENCIAL IMPACTO NA EPIDEMIOLOGIA DA LEPROSE DOS CITROS**

MATHEUS POTSCLAM BARRO

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

SÃO PAULO

2022

MATHEUS POTSCLAM BARRO

**CARGA VIRAL DAS ESTIRPES DE CITRUS LEPROSIS VIRUS C E SEU
POTENCIAL IMPACTO NA EPIDEMIOLOGIA DA LEPROSE DOS CITROS**

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

Orientadora: Juliana
Freitas-Astúa

Coorientador: Pedro
Luis Ramos-González

SÃO PAULO

2022

Eu **Matheus Potsclam Barro**, 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: Matheus Potsclam Barro Data 05 / 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

Barro, Matheus Potsclam.

Carga viral das estirpes de CiLV-C e seu potencial impacto na epidemiologia da leprose dos citros. / Matheus Potsclam Barro. - São Paulo, 2022.

65 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2022D.MB08

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: Julia de Freitas Astúa.

Versão do título para o inglês: Viral load of citrus leprosis virus C strains and its potencial impact on citrus leprosis epidemiology.

1. *Cilevirus* 2. *Kitaviridae* 3. Interação vírus-planta 4. Detecção 5. RT-qPCR I. Barro, Matheus Potsclam II. Astúa, Julia de Freitas III. González, Pedro Luis Ramos IV. Instituto Biológico (São Paulo) V. Título.

IB/Bibl./2022/008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Matheus Potsclam Barro

Título: Carga viral das estirpes de citrus leprosis virus C e seu potencial impacto na epidemiologia da leprose dos 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 Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES	12
AGRADECIMENTOS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. A citricultura no Brasil	18
2.2. Principais doenças que acometem a citricultura	18
2.3. Vírus transmitidos por ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i> (VTB)	19
2.4. Epidemiologia da leprose dos citros	22
2.5. Biologia dos ácaros <i>Brevipalpus</i>	23
2.6. Métodos de detecção do CiLV-C	24
4. OBJETIVO.....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. Amostras vegetais	26
5.3. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR para detecção de CiLV-C 27	27
5.4. Purificação do produto de PCR, clonagem molecular e extração de DNA plasmídial	28
5.5. Alinhamento e comparação de sequências do RNA 1 de CiLV-C para a seleção de alvos adequados para o desenho de sondas e iniciadores	28
5.6. Desenho dos iniciadores e sondas de hidrólise para a quantificação específica de CiLV-C_SJP e CiLV-C_CRD	29
5.7. Desenvolvimento de curva padrão para a quantificação absoluta das estirpes de citrus leprosis virus C utilizando RT-qPCR com sondas de hidrólise 30	30
5.8. Avaliação de especificidade e sensibilidade dos iniciadores em PCR	31
5.9. Cálculo de eficiência de amplificação em RT-qPCR por fluoróforos intercalantes	32
5.10. Avaliação de interferência das sondas em RT-qPCR para as estirpes de CiLV-C	32
5.11. Quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C	33
5.12. Análises estatísticas	34

6. RESULTADOS.....	34
6.1. Alinhamento e comparação de sequências para definição dos iniciadores e sondas para RT-qPCR.....	34
6.2. Avaliação de especificidade e sensibilidade dos iniciadores através de um ensaio por PCR ponto final.....	36
6.3. Ensaio em RT-qPCR com fluoróforos intercalantes com plasmídeos da curva padrão das estirpes de CiLV-C	37
6.4. Desenvolvimento do ensaio RT-qPCR com sondas de hidrólise para a quantificação das estirpes SJP e CRD de CiLV-C.....	38
6.5. Acumulação das estirpes de CiLV-C no epicarpo de frutos e no limbo foliar de citros	41
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÕES	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Lesões de leprose dos citros em ramos de <i>C. sinensis</i>	20
Figura 2 Micrografia de vírions de CiLV-C acumulados no retículo endoplasmático de células de laranjeira (BASTIANEL et al., 2010).	20
Figura 3 Organização genômica do CiLV-C. RdRp: RNA dependente de RNA polimerase; p29, p61 e p24: proteínas estruturais putativas; p15: função desconhecida; MP: proteína de movimento (modificado de RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).	22
Figura 4 Distribuição das estirpes de CiLV-C na América Latina (A) no período de 1932 até 2020 e (B) entre municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Dados baseados na detecção diferencial dos vírus das linhagens de CiLV-C a partir da identificação dos seus genes <i>p29</i> e <i>p24</i> (figura retirada de CHABI-JESUS et al., 2021).	23
Figura 5 Micrografia Eletrônica de Varredura do <i>Brevipalpus yothersi</i> (TASSI et al., 2017).	23
Figura 6 Lesões de leprose dos citros em folhas e frutos de <i>Citrus x sinensis</i> L. (Osbeck).	26
Figura 7 Organograma de experimentos para a quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C. A : Desenvolvimento da metodologia para a quantificação absoluta de CiLV-C. B : Processamento das amostras de laranjeira com sintomas característicos de leprose dos citros em tecidos de frutos e folhas.	27
Figura 8 A : Genoma do RNA de CiLV-C. B : Perfil de identidade do gene <i>RdRp</i> da estirpe CiLV-C_CRD com CiLV-C_SJP construído com o programa SimPlot. Eixo X: Posição dos nucleotídeos dentro a ORF. Eixo Y: Similaridade. C : Alinhamento do RNA 1 de CiLV-C com os iniciadores e sondas desenvolvidos para amplificar um segmento de <i>RdRp</i> . A : CiLV-C_SJP e B : CiLV-C_CRD.	35
Figura 9 Gel de agarose (2%) de PCR com gradiente de temperatura e diferentes diluições das amostras. A : Iniciadores para CiLV-C_CRD. B : Iniciadores para CiLV-C_SJP. B : controle da PCR. 1 a 3: Amostra CiLV-C_CRD com 120 pg, 12 pg e 1,2 pg de DNA, respectivamente. 4 a 6: Amostra CiLV-C_SJP com 120 pg, 12 pg e 1,2 pg de DNA, respectivamente.	37

Figura 10 A: Curva padrão para CiLV-C_SJP por fluoróforos intercalantes; **B:** Curva padrão para CiLV-C_CRD por fluoróforos intercalantes. **R²:** Coeficiente de determinação. **E:** eficiência de amplificação. **Y:** Declínio..... 38

Figura 11 Tratamentos para identificar interferência utilizando uma sonda e em multiplex. Ct: Cycle threshold. Diluições de 1 ng a 10⁻⁷ ng. **A:** plasmídeo CRD 10⁶ ng + 8 diluições do plasmídeo SJP detectando o plasmídeo CRD; **B:** plasmídeo CRD 10⁶ ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex detectando CRD; **C:** plasmídeo SJP com 10⁶ ng+ 8 diluições do plasmídeo CRD detectando apenas a sonda para SJP; **D:** plasmídeo SJP 10⁶ ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex com as duas sondas detectando SJP..... 39

Figura 12 Curvas padrão geradas a partir dos tratamentos multiplex quando apenas uma sonda e em multiplex. Ct: Cycle threshold. Diluições de 1 ng a 10⁻⁷ ng. **A:** plasmídeo CRD 10⁶ ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex com as duas sondas detectando SJP; **B:** plasmídeo SJP 10⁶ ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex com as duas sondas detectando CRD. 40

Figura 13 Curvas padrão obtidas utilizando plasmídeos recombinantes lineares com fragmentos da RdRp das estirpes de CiLV-C. **A:** Curva padrão para o CiLV-C_SJP. **B:** Curva padrão para o CiLV-C_CRD. **R²:** Coeficiente de determinação. **E:** Eficiência de amplificação. **Y:** Declínio 40

Figura 14 Média de carga viral das linhagens de CiLV-C de lesões individualizadas em frutos e folhas obtidas através de RT-qPCR por sondas de hidrólise. Avaliação estatística utilizada: Mann-Whitney. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005..... 42

Figura 15 Média de carga viral das estirpes CRD e SJP de CiLV-C em lesões de leprose dos citros de acordo com os anos de coleta em frutos em **A:** 2020; **B:** 2018; **C:** 2017. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney*: p-value <0,05. **: p-value <0,005. 43

Figura 16 Comparação da média de quantidade de moléculas dos vírus das estirpes de CiLV-C obtidas através de RT-qPCR das variedades ‘Pêra’ e ‘Valência Folha Murcha’ analisadas em frutos. **A:** Comparação de acumulação viral entre as estirpes de CiLV-C na variedade de copa ‘Pêra’. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney. **B:** Comparação de acumulação viral entre as estirpes de CiLV-C na variedade de copa ‘Valência Folha Murcha’. Avaliação estatística utilizada: Teste T. **C:** Acumulação viral

de CiLV-C_CRD em Laranja ‘Pêra’ no estado da Bahia e no cinturão citrícola SP-MG. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005..... 44

Figura 17 Média de quantidade de moléculas de CiLV-C_SJP de acordo com variedade de copa de laranjeira obtidas através da quantificação absoluta por RT-qPCR por sondas de hidrólise. **A:** Acumulação viral de CiLV-C_SJP nas variedades de copa analisadas. **B:** Acumulação viral de CiLV-C_CRD em Pêra e Valência Folha Murcha. Avaliação estatística utilizada: Teste Kruskal-Wallis. 45

Figura 18 Média de acumulação viral das estirpes de CiLV-C de acordo com os setores do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais. **A:** Carga viral de CiLV-C_SJP e CRD no setor Centro. **B:** Carga viral de CiLV-C_SJP e CRD no setor Sul. **C:** Carga viral de CiLV-C_SJP nos setores citrícolas do Estado de São Paulo e Minas Gerais. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005. Avaliações estatísticas utilizadas: Teste Mann-Whitney e Teste Kruskal-Wallis..... 46

Figura 19 A: Distribuição geográfica dos setores citrícolas dos estados SP e MG. As barras representam a acumulação viral das estirpes de CiLV-C. **B:** Taxa de queda de frutos (%) causados pela leprose dos citros nas áreas do cinturão citrícola, modificada de (FUNDECITRUS, 2022a)..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de iniciadores utilizados para detecção de estirpes do CiLV-C por RT-PCR.	28
Tabela 2. Relação das regiões alvos, fluoróforos e sequência dos iniciadores e sondas desenvolvidos para a quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C.....	30
Tabela 3 Iniciadores utilizados para obter os amplicons para a curva padrão de RT-qPCR para CiLV-C.	30
Tabela 4 Frequência de SNPs dentro da região de anelamento de sondas e iniciadores específicos para a amplificação de parte da RdRp de CiLV-C_SJP.....	36

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 Amostras de frutos com leprose dos citros utilizados para a quantificação absoluta das linhagens de CiLV-C.....	58
Tabela Suplementar 2 Lesões do limbo foliar de <i>Citrus x sinensis</i> utilizadas para a quantificação das estirpes de CiLV-C.....	63
Tabela Suplementar 3 Avaliações estatísticas dos grupos amostrais para as estirpes CiLV-C_SJP e CRD.....	65

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de mestrado no país (processo 2020/ 06378-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado (março 2020 – agosto 2020). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos colaboradores do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM) e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP) pelo envio de amostras de plantas e ácaros para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus orientadores Juliana e Pedro, por fazerem esse projeto se tornar possível.

Aos meus colegas do Instituto Biológico, por me apoiarem técnica e emocionalmente.

RESUMO

BARRO, Matheus Potsclam. Carga viral das estirpes de citrus leprosis virus C e seu potencial impacto na epidemiologia da leprose dos citros. 2022. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo. 2022.

A leprose dos citros (LC) é a doença viral que mais afeta a citricultura brasileira. Embora causada por diferentes patógenos, o cilevírus citrus leprosis virus C (CiLV-C) é o agente prevalente no país. Duas linhagens deste vírus, CiLV-C_SJP (São José do Rio Preto) e CiLV-C_CRD (Cordeirópolis), têm sido identificadas nos pomares comerciais do cinturão citrícola brasileiro, situado nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os sintomas característicos da infecção por CiLV-C são manchas necróticas e/ou cloróticas localizadas nos frutos, ramos e folhas principalmente de laranjeiras doce (*Citrus x sinensis* L. Osbeck). A estirpe CiLV-C_SJP foi identificada pela primeira vez no Estado de São Paulo em 2016. Após o sequenciamento do seu genoma e estabelecimento de um método específico de detecção, percebeu-se que a estirpe SJP é prevalente dentro do cinturão citrícola, mas ausente das outras áreas de produção de citros no Brasil e no exterior. Visando contribuir e esclarecer as bases moleculares desta distribuição diferencial das estirpes, o objetivo deste trabalho foi estudar a carga viral das estirpes SJP e CRD mediante a quantificação absoluta do genoma viral nos tecidos de frutos e folhas de laranjeiras doce. Para isso, foi desenvolvido um método de detecção baseado em PCR quantitativo com sondas de hidrólise (RT-qPCR). Os iniciadores e as sondas foram desenhados tomando em conta a variabilidade genética reconhecida em mais de 70 isolados virais das duas estirpes. Para o desenvolvimento e a caracterização do método foram construídas curvas padrão para cada estirpe utilizando plasmídeos recombinantes. Os iniciadores específicos para os segmentos alvo dentro do gene *RdRp* das estirpes SJP e CRD foram validados mediante RT-PCR de ponto final e RT-qPCR com fluoróforos intercalantes. Por fim, o método RT-qPCR por sondas de hidrólise demonstrou ter alto coeficiente de determinação ($> 0,9$) e eficiências de amplificação de $E= 1,0$ e $E= 0,99$ para as estirpes CRD e SJP, respectivamente. Duzentas e quatorze amostras de frutos de laranjas doce com sintomas de leprose, coletadas entre 2017 e 2022 em pomares comerciais ou não, e 140 lesões obtidas de folhas de diferentes locais foram avaliadas mediante ensaios de RT-qPCR com sondas específicas. Observou-se que a estirpe SJP alcança um acúmulo de até nove vezes mais moléculas virais que a CRD, e sua carga viral nos frutos é ao menos três vezes superior que em folhas. Baseado nesses resultados, discutiu-se a possível vantagem adaptativa da estirpe SJP e a sua relação com a epidemiologia do CiLV-C. O estudo provê, ainda, dados que podem contribuir com a compreensão da interação das estirpes de CiLV-C com as variedades de copa e sua relação com possíveis fatores agroambientais dos diferentes setores do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais.

PALAVRAS-CHAVE: CiLV-C, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, interação vírus-planta, detecção, RT-qPCR.

ABSTRACT

BARRO, Matheus Potsclam. Viral load of citrus leprosis virus C strains and its potential impact on citrus leprosis epidemiology. Thesis (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo. 2022.

Citrus leprosis (CL) is the prevalent viral disease in the Brazilian citriculture. Although caused by several pathogens, the cilevirus citrus leprosis virus C (CiLV-C) is the major causal agent in Brazil. Two main lineages of the virus, CiLV-C_SJP (São José do Rio Preto) and CiLV-C_CRD (Cordeirópolis), are identified in the Brazilian citrus belt, situated in São Paulo and the southwestern of Minas Gerais. The characteristic symptoms induced by CiLV-C are localized chlorotic and necrotic lesions on fruits, leaves and stems of mainly sweet oranges (*Citrus x sinensis*L. Osbeck). The CiLV-C_SJP was found for the first time in the state of São Paulo in 2016. After the sequencing of its genome and the establishment of a specific method of detection, it was found that this lineage is widespread in the Brazilian citrus belt but absent in other citrus-producing areas in Brazil and abroad. To contribute and clarify the molecular bases of the differential distribution of the two CiLV-C strains, the goal of this work was to study the viral load of the two lineages of CiLV-C and perform the absolute quantification of the viral genomes in fruit and leaf tissues. Therefore, it was developed a method of detection based on quantitative RT-PCR using hydrolysis probes (RT-qPCR probes). Probes and primers were developed considering the genetic variability of more than 70 viral isolates from both lineages. To the development and characterization of the method, standard curves using recombinant plasmids were built. The specific primers for the *RdRp* segment of SJP and CRD were validated originally by RT-PCR and RT-qPCR employing intercalating fluorophores. The probes evaluation showed high determination coefficient (>0.9) for both CiLV-C lineages probes, and efficiency of amplification $E=1.0$ and $E=0.99$ for the CRD e SJP strains, respectively. Two hundred and fourteen samples of sweet orange fruits symptomatic for leprosis, collected between 2017 and 2022 from commercial orchards or backyards, and 140 leaf lesions collected from different locations were evaluated using specific RT-qPCR probe method. Our data shows that CiLV-C_SJP reaches up to nine times more viral molecules than CRD, and the viral load in fruits is 3 times higher than in leaves. Based on these results, the potential adaptive advantage of SJP strain and its impact regarding the epidemiology of CiLV-C were discussed. Additionally, this study sheds light on the interaction of both lineages with scion varieties and their relationship with possible agri-environmental aspects, through the analyses of different geographic sectors within the citrus belt of São Paulo and Minas Gerais.

KEY-WORDS: CiLV-C, *Cilevirus*, *Kitaviridae*, plant-virus interaction, detection, RT-qPCR.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes doenças e pragas podem afetar a citricultura. A leprose dos citros (LC), presente em muitos países principalmente da América Latina, é uma doença viral que induz lesões locais necróticas e/ou cloróticas nos frutos, ramos, e folhas, preferencialmente das laranjeiras (*Citrus x sinensis* L. Osbeck) (LOCALI-FABRIS et al., 2006). Dependendo do clima e do número de lesões, a LC pode causar desfolha severa, queda prematura dos frutos, seca dos ramos, o que promove uma redução drástica na produção das plantas afetadas (BASTIANEL et al., 2010). O manejo da doença depende fundamentalmente do controle do ácaro vetor, uma ação que no cinturão citrícola brasileiro, compreendido entre São Paulo e Minas Gerais, demanda gastos na ordem de ≈ US\$54 milhões anualmente (BASSANEZI et al., 2019). Além disso, na safra de 2021/2022, a LC causou a queda prematura de 9,5 milhões de caixas de laranjas, o que representa perdas de ≈ 280 milhões de reais (FUNDECITRUS, 2022a; MOREIRA et al., 2022).

O primeiro relato da LC foi em 1907, nos Estados Unidos (FAWCETT, 1911). A doença foi identificada no Brasil inicialmente em 1931, em Sorocaba, SP (BITANCOURT, 1940a), e atualmente está disseminada por todo o território nacional, sendo considerada endêmica (CHABI-JESUS et al., 2021). A LC afeta ainda a citricultura de diversos países da América do Sul, de todos os países da América Central e do México (BASTIANEL et al., 2010; ROY et al., 2015; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). A presença da enfermidade também já foi relatada em citros na África do Sul (COOK et al., 2019) e, recentemente, no Havaí (EUA) (OLMEDO-VELARDE et al., 2021).

A LC é causada por um grupo de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus*, que abreviadamente são denominados **VTBs**. Do ponto de vista molecular, esses agentes causais são filogeneticamente diversos, classificados nos gêneros *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, e *Dichorhavirus*, família *Rhabdoviridae*. Os cilevírus são conhecidos como VTB citoplasmáticos por se replicarem no citoplasma de células infectadas. Dois cilevírus que infectam citros já foram descritos: o citrus leprosis virus C (CiLV-C) (LOCALI-FABRIS et al., 2006) e o citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) (ROY et al., 2012), ambos transmitidos por ácaros da espécie *Brevipalpus yothersi* (ROY et al., 2015; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

O gênero *Brevipalpus* abrange em torno de 300 espécies de ácaros; porém, menos de uma dezena delas tem sido reconhecida como vetores de fitovírus (DE LILLO et al., 2021). Particularmente *B. yothersi* e *B. papayensis* são comprovadamente vetores do CiLV-C, o principal agente causal da LC (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016; NUNES et al., 2018).

O CiLV-C possui três linhagens distintas: (i) Cordeirópolis (CRD), caracterizada ao nível molecular em 2006 a partir de uma amostra originalmente identificada em Cordeirópolis, SP, e prevalente na América Latina (CHABI-JESUS et al., 2021); (ii) Assunção (ASU), sequenciada a partir de uma amostra herborizada de laranjeira coletada no Paraguai em 1937, ainda não encontrada em campo e (iii) São José do Rio Preto (SJP), primeiramente identificada em amostras coletadas em São José do Rio Preto, SP, em 2015. A estirpe SJP aparentava ter uma distribuição restrita, detectada em apenas três municípios do cinturão citrícola (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Contudo, dados obtidos a partir de um estudo abrangendo novas localidades, no período de 2017 a 2020, revelaram que SJP é prevalente no cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais (SP-MG), presente em mais de 50% das amostras testadas (CHABI-JESUS et al., 2021). Por outro lado, vinte por cento das amostras avaliadas apresentaram infecções mistas entre as estirpes SJP e CRD. Essa distribuição irregular entre as estirpes no cinturão citrícola pode estar associada com uma interação desigual entre o vírus, seu vetor e/ou seu hospedeiro.

Com o intuito de compreender a epidemiologia de estirpes de CiLV-C e os possíveis fatores que determinam a predominância da linhagem SJP nos pomares da região do cinturão citrícola, foi desenvolvido um ensaio RT-qPCR por sondas de hidrólise para a quantificação absoluta dos genomas virais e para desvendar as possíveis relações entre a carga viral e as variedades de copa, órgãos vegetais infectados e setores (grandes áreas geográficas) do cinturão citrícola. Os resultados revelaram uma dissimetria entre as cargas virais das estirpes de CiLV-C e uma possível relação entre carga viral/estirpe com as variedades de laranjeiras mais frequentes na citricultura brasileira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A citricultura no Brasil

A laranjeira (*Citrus x sinensis* L. Osbeck), planta de origem asiática da família Rutaceae, ordem Sapindales, é a base de umas das culturas de maior importância agrícola no mundo devido à sua adaptação ecológica dentro da grande faixa intertropical do planeta (PASSOS, 1990). A origem da laranjeira aconteceu numa região que compreende a Indochina e o sul da China, depois foi introduzida na Índia e no meio oriente. Os árabes provavelmente cultivaram a laranjeira azeda (*C. aurantium* L.), o limoeiro (*C. limon* L.), e talvez a laranjeira doce na Palestina, Egito, sul da Europa e litoral leste da África entre os séculos XII e XV. Os colonizadores europeus distribuíram a laranjeira pelas Américas. No Brasil, ela foi introduzida por volta de 1530, provavelmente no estado da Bahia, mas passou a se tornar comercial apenas no século XX (PASSOS, 1990).

O Brasil é o maior produtor de laranja e de suco de laranja do mundo. A safra de 2020/21 foi de 268,63 milhões de caixas de frutos (FUNDECITRUS, 2021a). O cinturão citrícola (região centro-norte de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais) é responsável por mais de 60% da produção brasileira de laranjas. A citricultura é um dos maiores empregadores dentro da agricultura no sudeste do país, e é responsável por gerar milhares de empregos diretos e indiretos.

Embora seja o maior centro de produção de suco de laranja do mundo, a citricultura brasileira sofre com diversos problemas que acarretam a queda prematura de frutos. A safra de 2020/2021 teve a mais alta taxa de queda de laranjas já medida pelo Fundecitrus desde a criação da Pesquisa de Estimativa de Safra (PES) (FUNDECITRUS, 2021b), sendo em grande parte decorrente do ataque de pragas ou patógenos.

2.2. Principais doenças que acometem a citricultura

Doenças de diferentes etiologias podem afetar a cultura dos citros no país. O *huanglongbing* (HLB) ou *greening*, causado por bactérias *Candidatus Liberibacter* spp. transmitidas pelo psílideo *Diaphorina citri*, é considerada a principal doença que afeta as laranjeiras atualmente. Dentre as doenças virais, são relevantes a tristeza dos citros e a leprose dos citros. A tristeza dos citros é ocasionada pelo citrus tristeza virus (CTV), gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae*, o qual é transmitido principalmente pelo

pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*). O CTV foi encontrado pela primeira vez no Brasil em 1937 e caracterizado no Instituto Biológico (BITANCOURT, 1940b). A doença causa a morte rápida das árvores enxertadas em porta-enxertos como laranja azeda (*Citrus aurantium*). No entanto, hoje a doença encontra-se sob controle em função da substituição dos porta-enxertos suscetíveis para outros tolerantes, como o limão-cravo (*Citrus limonia*), e da premunização das laranjeiras Pêra com isolados fracos do vírus (COSTA; MULLER, 1980).

2.3. Vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTB)

Com o controle da tristeza dos citros, a principal doença viral da citricultura brasileira tem sido a leprose dos citros (LC), causada majoritariamente pelo cilevírus citrus leprosis virus C (CiLV-C) e transmitida por ácaros do gênero *Brevipalpus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006). Genericamente, CiLV-C e os outros vírus do complexo são conhecidos como vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB). Os VTBs são classificados de acordo com seu local de replicação nas células hospedeiras: VTBs citoplasmáticos (VTB-C) replicam-se no citoplasma e taxonomicamente são membros do gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, e VTBs nucleares (VTB-N) replicam-se no núcleo das células infectadas e são membros do gênero *Dichorhavirus*, família *Rhabdoviridae*. O gênero *Dichorhavirus*, família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales* possui cinco espécies: *Dichorhavirus orchidaceae*, *Dichorhavirus coffeae*, *Dichorhavirus clerodendri*, *Dichorhavirus leprosis* e *Dichorhavirus citri* (KUHN et al., 2021). Dentre eles, o orchid fleck virus (OFV) (*Dichorhavirus orchidaceae*), descrito pela primeira vez no Japão, é o único VTB que possui distribuição mundial (KONDO; MAEDA; TAMADA, 2003). A sua grande disseminação pode estar associada ao comércio, legal e ilegal, de orquídeas que ocorrem pelo mundo, o que pode ter contribuído com a dispersão do ácaro vetor e do vírus. Estirpes de OFV que produzem LC foram encontradas infectando naturalmente laranjeiras doce na Colômbia, no México, na África do Sul e no Haváí (EUA) (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; ROY et al., 2014; COOK et al., 2019; OLMEDO-VELARDE et al., 2021). No Brasil, citrus leprosis virus N (CiLV-N) (*Dichorhavirus leprosis*) e citrus chlorotic spot virus (CiCSV) (*Dichorhavirus citri*) foram relatados causando sintomas de LC em laranjeiras doces cultivadas em fundos de quintal ou pequenas áreas de produção, respectivamente, nos estados de São Paulo e Piauí (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017; CHABI-JESUS et al., 2018a).

O gênero *Cilevirus*, família *Kitaviridae*, ordem *Martellivirales*, possui quatro espécies descritas, sendo elas: *Citrus leprosis virus C* (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006), *Citrus leprosis virus C2* (ROY et al., 2012), *Passion fruit ringspot virus* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020) e *Cilevirus oahuense* (OLMEDO-VELARDE; HU; MELZER, 2021). Ademais, *Solanum violifolium ringspot virus* (SvRSV), *Ligustrum chlorotic spot virus* (LigCSV) e *Ligustrum leprosis virus* (LigLV) correspondem a membros tentativos do gênero (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2022).

CiLV-C é o vírus com maior amplitude geográfica dentre os cilevírus, estando presente em pelo menos 14 países da América Latina (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018). O vírus afeta principalmente as laranjeiras doces, e em menor grau outras espécies ou híbridos de citros, menos os limoeiros (*Citrus limon*) e as limas ácidas (*C. latifolia*), entre outras,



Figura 2 Lesões de leprose dos citros em ramos de *Citrus x sinensis* L. (Osbeck).

que são imunes (BASTIANEL et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). As lesões com halos cloróticos e centro com tecido necrótico (Figura 1) podem ser o resultado de um processo semelhante à resposta de hipersensibilidade (HR), provavelmente devido a uma interação incompatível entre a proteína P61, considerada um efetor viral tentativo, e seu hospedeiro (ARENA et al., 2016, 2020) CiLV-C também pode infectar naturalmente a rutácea *Swinglea glutinosa*, com relatos na Colômbia (LEÓN et al., 2008), e traçoeraba

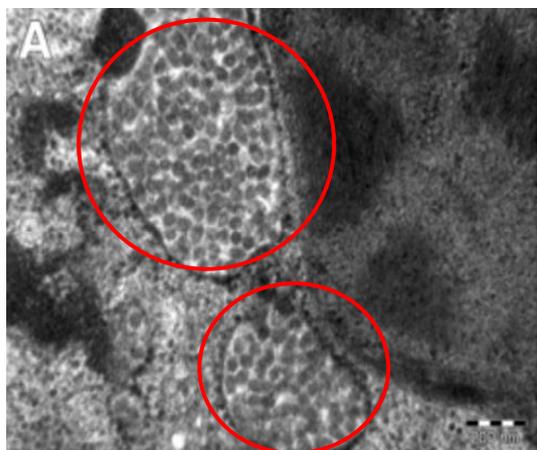


Figura 1 Micrografia de vírions de citrus leprosis vírus C (CiLV-C) acumulados no retículo endoplasmático de células de laranja (BASTIANEL et al., 2010).

(*Commelina benghalensis*), uma monocotiledônea comumente encontrada em pomares de citros no Brasil (NUNES et al., 2012). Na Colômbia, o CiLV-C2 infecta laranjeiras doces, *S. glutinosa* e plantas ornamentais como *Dieffenbachia* sp. e *Hibiscus rosa-sinensis* (ROY et al., 2015). Além disso, CiLV-C2 já foi encontrado em plantas de hibisco nos estados norte-

americanos de Havá e Flórida (MELZER et al., 2013; ROY et al., 2018).

Os cilevírus possuem partículas envelopadas em formato baciliforme (60-70 x 120-150 nm) (Figura 1), e seu genoma é bissegmentado e apresenta uma fita de RNA simples fita positiva, com cauda de poli A no extremo 3'. Em consequência de a estratégia de replicação ser no sentido positivo, a expressão das proteínas do RNA 1 P29; e RNA 2, P61, MP e P24 são feitas através de RNA sub-gênomico, enquanto RdRp e P15 são expressas diretamente através do RNA genômico. O RNA1, de ~9 kb, engloba dois quadros abertos de leitura (ORF, do termo em inglês open reading frame), *RdRp* e *p29*, que codificam a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e uma proteína de 29 kDa que é a possível proteína de capsídeo P29. O RNA2, ~5 kb, codifica quatro ORFs (*p15*, *p61*, *mp*, e *p24*) que correspondem a proteínas de 15 kDa (P15), 61 kDa (P61), 32 kDa (MP) e 24 kDa (P24) (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). P15, P61 e P24 são proteínas sem função definida, mas podem estar associadas à supressão do mecanismo de silenciamento de RNA (LEASTRO et al., 2020). A P61 é uma possível glicoproteína cuja expressão ectópica desencadeia HR-like em plantas de *Nicotiana benthamiana* (ARENA et al., 2020). A MP é uma proteína com características da superfamília 30K (MUSHEGIAN; ELENA, 2015; LEASTRO et al., 2021) (Figura 3). Os cilevírus apresentam uma região intergênica no extremo 5' do RNA2, sendo que pequenas ORFs podem ser encontradas em alguns membros do gênero (QUITO-AVILA; FREITAS-ASTÚA; MELZER, 2021; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020, 2021) (Figura 3).

As partículas dos cilevírus se acumulam na cisterna do retículo endoplasmático (ER) das células, e em viroplasmas elétron-densos com diversos formatos (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003). A morfogênese das partículas pode ocorrer em estruturas membranosas derivadas do ER. Em condições naturais, não há movimentação sistêmica dos cilevírus na planta (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003; FREITAS-ASTÚA et al., 2018).

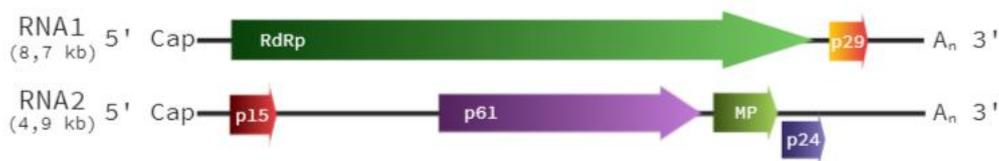


Figura 3 Organização genômica do CiLV-C. RdRp: RNA dependente de RNA polimerase; p29, p61 e p24: proteínas estruturais putativas; p15: função desconhecida; MP: proteína de movimento (modificado de RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016).

2.4. Epidemiologia da leprose dos citros

O CiLV-C possui três linhagens caracterizadas. As duas primeiras devem seus nomes aos seus primeiros vírus isolados e sequenciados: isolado Cordeirópolis (CRD) (LOCALI-FABRIS et al., 2006) e São José do Rio Preto (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Por fim, um isolado obtido a partir do sequenciamento de RNA de pequeno tamanho (siRNA) de folhas de laranjeira herborizadas do Instituto Biológico foi denominado Asunción (ASU) (CHABI-JESUS et al., 2021). Assim, a linhagem ASU possui um único membro caracterizado, e se desconhece a possível existência de outros isolados dessa linhagem. Os vírus das três linhagens possuem aproximadamente 85% de identidade nucleotídica entre eles.

Através de um levantamento de amostras herborizadas do Instituto Biológico foi possível reconhecer que os relatos de CiLV-C no Brasil desde a década de 1930 provavelmente correspondem a vírus da linhagem CRD (CHABI-JESUS et al., 2021). Em 2016, um estudo com amostras de campo revelou a existência de vírus da linhagem SJP, mas com baixa prevalência (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). No entanto, no período de 2017-2020, uma amostragem que incluía mais de 200 localidades em mais de 100 municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais revelou que vírus da linhagem SJP são mais frequentes no cinturão citrícola (CHABI-JESUS et al., 2021). Os dados sugerem que vírus dessa linhagem podem ser mais eficientes na sua interação com a planta e/ou com o vetor, garantindo uma melhor disseminação do que aqueles da linhagem CRD.

Vírus da estirpe CRD já foram detectados em diversos países da América Latina, mas no cinturão citrícola são pouco encontrados e, quando identificados, normalmente estão em infecção mista (CHABI-JESUS et al., 2021). Enquanto isso, a

linhagem SJP encontra-se prevalente, mas restrita à maior área de produção de laranjas do Brasil (Figura 4).

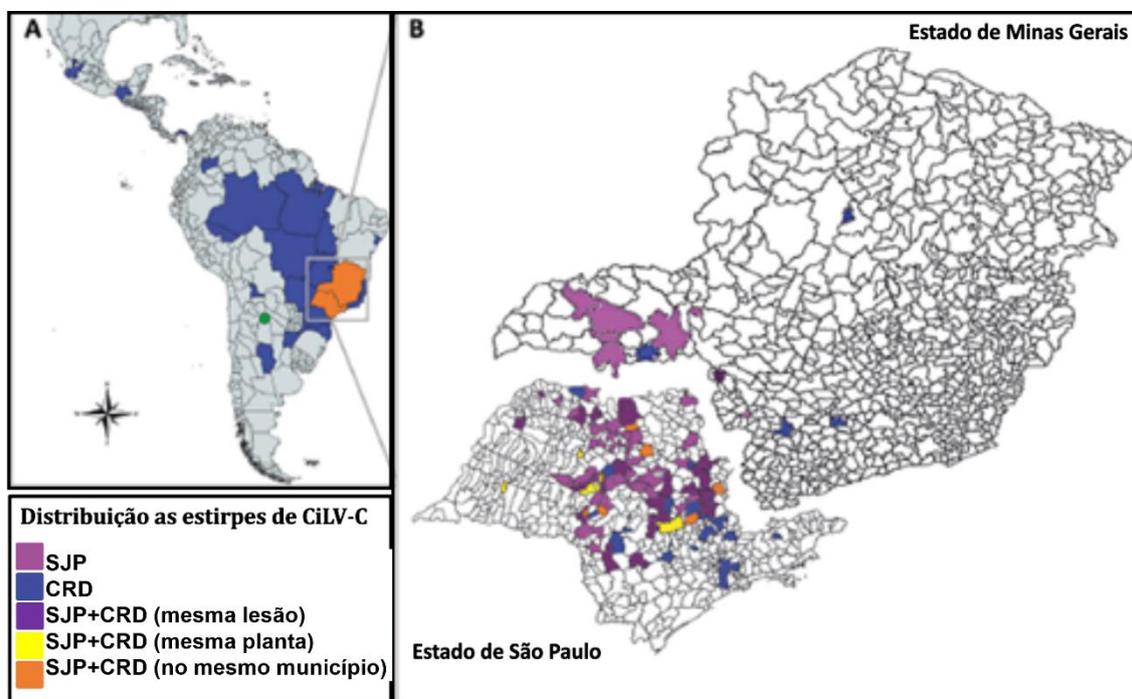


Figura 4 Distribuição das estirpes de CiLV-C na América Latina (A) no período de 1932 até 2020 e (B) entre municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Dados baseados na detecção diferencial dos vírus das linhagens de CiLV-C a partir da identificação dos seus genes *p29* e *p24* (figura retirada de CHABI-JESUS et al., 2021).

2.5. Biologia dos ácaros *Brevipalpus*

Aproximadamente uma dezena de ácaros do gênero *Brevipalpus* (família: Tenuipalpidae) são vetores de fitovírus (DE LILLO et al., 2021). Em geral, esses ácaros são polípagos, cosmopolitas, e colonizam diversas culturas de importância econômica, entre elas os citros, o café (*Coffea* spp.), o maracujá (*Passiflora* spp.), além de inúmeras espécies ornamentais (FREITAS-ASTÚA et al., 2018) (Figura 5). Para se alimentarem, os ácaros injetam a saliva nas células do mesófilo da planta usando seu estilete. Depois de retirarem o estilete, o conteúdo que extravasou das células perfuradas é sugado pela cavidade pré-oral.



Figura 5 Micrografia eletrônica de Varredura do *Brevipalpus yotheresi* (TASSI et al., 2017).

Algumas espécies de *Brevipalpus* são haploides durante todo o seu ciclo de vida, se

reproduzem a partir de partenogênese telítoca, e a sua população é essencialmente constituída por fêmeas devido à presença da bactéria endossimbionte *Cardinium* sp. (WEEKS; MAREC; BREEUWER, 2001; KITAJIMA; ALBERTI, 2014). Uma vez adquirido durante qualquer fase ativa de vida (larva, protoninfa, deutoninfa e adulto), o CiLV-C provavelmente não se propaga no vetor, mas persiste nele de maneira circulativa (TASSI et al., 2017, 2022), apesar de existirem dados controversos sobre a possível propagação viral no vetor (ROY et al., 2015).

B. yothersi Baker é a espécie mais comum do seu gênero em pomares de citros no Brasil (DE LILLO et al., 2021). Esse ácaro é o principal vetor de CiLV-C e CiLV-C2. CiLV-C também é transmitido, experimentalmente, por *B. papayensis* (NUNES et al., 2018). Por outro lado, o dichorhavirus OFV-citros é transmitido por *B. californicus* (GARCÍA-ESCAMILLA et al., 2018) e o CiLV-N por *B. phoenicis* s.s. (Geijskes) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). *B. yothersi* e/ou *B. aff. yothersi* são os vetores de CiCSV (CHABI-JESUS et al., 2018b).

2.6. Métodos de detecção do CiLV-C

Métodos de detecção sensíveis e específicos são necessários para identificar com rapidez os vírus e estudar diferentes aspectos da sua biologia e epidemiologia, assim como desenvolver e avaliar estratégias para o controle de doenças por ele causadas. Destaque pode ser dado para métodos de biologia molecular como RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), RT-qPCR (*Real Time Quantitative RT-PCR*), e técnicas sorológicas como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (RUBIO; GALIPIENSO; FERRIOL, 2020).

Depois do sequenciamento parcial do genoma do CiLV-C, iniciadores para PCR que amplificam uma área do gene *mp* e outra do gene *RdRp* foram desenvolvidos (LOCALI et al., 2003). Contudo, devido ao desconhecimento da variabilidade genética do vírus, o método não poderia fazer distinção entre as diferentes linhagens de CiLV-C. Em seguida ao primeiro relato da linhagem SJP, foi estabelecido um ensaio tipo PCR baseado em sequências do gene *p29* do RNA 1 que permitiu a detecção diferencial das estirpes (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Posteriormente, com o conhecimento de novos membros das linhagens, foram desenhados iniciadores que têm como alvo o gene

p24 e que facilitaram, ainda com maior certidão, a detecção diferencial dessas linhagens (CHABI-JESUS et al., 2021).

Apesar de métodos moleculares serem simples e confiáveis, alternativas para diminuir o custo de detecção foram avaliadas utilizando procedimentos imunológicos. A ORF *p29* do RNA 2 de CiLV-C foi clonada e expressada para a purificação, produção de anticorpos policlonais e uso em PTA-ELISA (Plate Trapped Antigen) com alta eficiência (CALEGARIO et al., 2013). Anticorpos monoclonais para a proteínas P29 de CiLV-C e CiLV-C2 também foram obtidos (CHOUDHARY et al., 2014, 2017), mas, embora tenham demonstrado alta sensibilidade e especificidade, os procedimentos não estão disponíveis comercialmente (CALEGARIO et al., 2013). Dessa forma, o método padrão para detectar a presença de CiLV-C é a técnica de RT-PCR.

3. HIPÓTESE

Tendo como premissa a distribuição irregular das estirpes do CiLV-C no cinturão citrícola, neste trabalho nos propomos a verificar a hipótese segundo a qual os vírus da linhagem SJP atingem maior carga viral que os da linhagem CRD nas plantas hospedeiras. Para testá-la, propusemos quantificar, mediante a técnica de RT-qPCR utilizando sondas de hidrólise, os genomas dos isolados de CiLV-C em amostras de laranjeiras de campos comerciais comparando a carga viral de lesões do epicarpo de frutos e do limbo foliar.

4. OBJETIVO

Quantificar a carga viral das estirpes CRD e SJP do cilevírus CiLV-C em laranjeiras de pomares dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia.

Objetivos específicos

- (i) Desenhar e desenvolver um sistema RT-qPCR com sondas de hidrólise para a quantificação específica das estirpes de CiLV-C;
- (ii) Quantificar a carga viral das estirpes de CiLV-C por RT-qPCR em lesões de frutos e folhas;
- (iii) Determinar a carga viral de SJP e CRD nos setores citrícolas de SP-MG e em variedades de copa de laranjeiras no cinturão citrícola.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostras vegetais

Amostras de *Citrus x sinensis* L. (Osbeck) sintomáticas para leprose foram coletadas de frutos do cinturão citrícola de SP e MG e das cidades de Bom Jesus da Lapa e Cruz das Almas, BA, no período de 2017-2022. Além disso, folhas de laranjeiras com sintomas de leprose foram recebidas dos municípios de Piracicaba e Cordeirópolis, SP, e de pomares do estado de Bahia. As amostras foram enviadas por colaboradores do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM) e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) (Figura 6). Lesões individuais foram isoladas cortando apenas a região sintomática, clorótica ou necrótica, do epicarpo dos frutos ou do limbo foliar. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -80°C até a extração de RNA.



Figura 6 Lesões de leprose dos citros em folhas e frutos de *Citrus x sinensis* L. (Osbeck).

5.2. Organograma de experimentos

O roteiro deste trabalho contém duas etapas sequenciais. A primeira delas consiste em desenvolver a metodologia para a quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C e inclui desde o desenvolvimento de iniciadores e sondas até o estabelecimento e padronização do RT-qPCR por sondas de hidrólise. A segunda consiste em processar

as amostras de laranjeiras com sintomas característicos de leprose em tecidos de frutos e folhas e quantificar a carga viral, analisando seu comportamento de acordo com ano de coleta e setor (localidade macrogeográfica) do cinturão citrícola, assim como as variedades das laranjeiras afetadas (Figura 7).

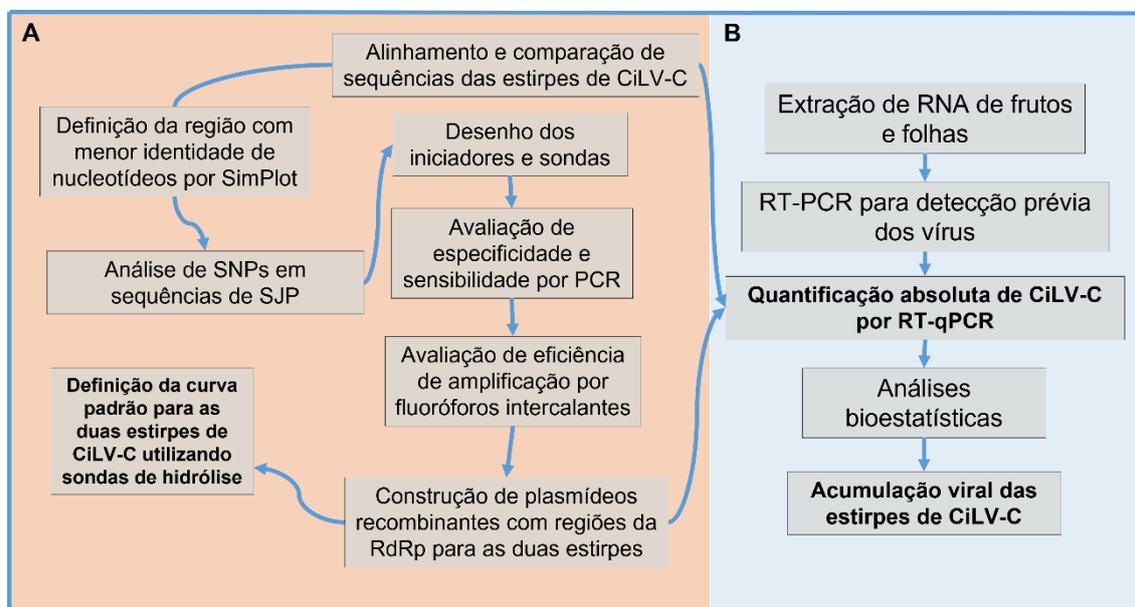


Figura 7 Organograma de experimentos para a quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C. **A:** Desenvolvimento da metodologia para a quantificação absoluta de CiLV-C. **B:** Processamento das amostras de laranja com sintomas característicos de leprose dos citros em tecidos de frutos e folhas.

5.3. Extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR para detecção de CiLV-C

O RNA total de lesões individualizadas de tecido dos frutos de laranja foi extraído mediante o método de Trizol[®] seguindo as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A maceração dos tecidos foi feita utilizando pistilo e cadinho com nitrogênio líquido para os frutos e FASTPREP com três beads de metal por tubo para as folhas. A síntese de DNA complementar (cDNA) empregando iniciadores randômicos foi feita com GoScript Reverse Transcriptase e PCR com GoTaq G2 Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) com iniciadores específicos para os genes *p24* das estirpes SJP e CRD (Tabela 1) (CHABI-JESUS et al., 2021).

Tabela 1 Lista de iniciadores utilizados para detecção de estirpes do CiLV-C por RT-PCR.

Vírus/estirpe	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Referência
CiLV-C/SJP e CRD	p29-F: GCGTATTGGCGTTGGATTCTGAC	(CHABI-JESUS, não publicado)
	p29-R: TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT	
CiLV-C/SJP	p24-F: GTAARCAAAAGGTCGAGGTTGTCC	(CHABI-JESUS et al., 2021)
	p24-R: TCTGTTGTCTAGCAGCAGTAATG	
CiLV-C/CRD	p24-F: CAGAAGGCCGAGGTTGTAAAG	
	p24-R: GTAGTGATCACTGAACTCGAATACC	

5.4. Purificação do produto de PCR, clonagem molecular e extração de DNA plasmídial

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, Madison, WI, EUA). Os fragmentos foram ligados ao vetor pGEM- T-Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, EUA). Para a transformação por eletroporação da cepa de *Escherichia coli* DH10B foi seguido o protocolo de HANAHAN (1983).

As colônias foram submetidas a PCR para a detecção do fragmento desejado utilizando GoTaq G2 Master Mix, com algumas modificações: 4 µL do G2 Master Mix, 3,8 µL de água livre de DNAase e RNAase e 0,2 µL do par de iniciadores adequados. Das colônias identificadas, a extração de DNA plasmídial recombinante foi realizada pelo método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Para confirmar a presença do inserto no plasmídeo recombinante foi feita uma digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, seguida de sequenciamento e alinhamento com as sequências disponíveis no GenBank utilizando o software MEGAX (KUMAR et al., 2018).

5.5. Alinhamento e comparação de sequências do RNA 1 de CiLV-C para a seleção de alvos adequados para o desenho de sondas e iniciadores

Para escolher a região do genoma com diferença nucleotídica suficiente para permitir a detecção diferencial das duas linhagens de CiLV-C, 18 sequências completas ou parcialmente completas de CiLV-C_SJP e CiLV-C_CRD foram alinhadas (CHABI-JESUS et al., 2021). Os perfis de identidade de nucleotídeos da ORF *RdRp* das duas estirpes foram analisados utilizando o programa SimPlot 3.5.1 (LOLE et al., 1999). As porcentagens de identidade foram calculadas para cada janela de 30 nucleotídeos e com um nucleotídeo de intervalo entre janela de cada vez.

Devido à pequena quantidade de sequências genômicas completas da linhagem SJP, um estudo de variabilidade genética com 46 isolados coletados em diferentes anos e municípios do estado de São Paulo foi realizado. As amostras selecionadas passaram pelo processo de extração de RNA, RT-PCR e confirmação por PCR ponto final utilizando iniciadores específicos para a detecção diferencial. Para CiLV-C_SJP foi feita amplificação utilizando iniciadores que anelam numa região da *RdRp* próxima ao que foi encontrado pelo SimPlot (LOLE et al., 1999). Em seguida, para isolar os haplótipos, foram feitas clonagens moleculares utilizando o vetor pGEM-T Easy em *E. coli* DH10B. As colônias recombinantes foram confirmadas e submetidas a sequenciamento pelo método Sanger. Em conjunto com sequências do GenBank, foram obtidas 51 sequências parciais de isolados de CiLV-C_SJP. Todas as sequências foram comparadas com as sequências dos isolados de referência de cada linhagem: CiLV-C_SJP_01 (GenBank: KP336747) e CiLV-C CRD (GenBank: NC008169) utilizando MEGAX (KUMAR et al., 2018) e Geneious Prime 2021.1 (<https://www.geneious.com>).

5.6. Desenho dos iniciadores e sondas de hidrólise para a quantificação específica de CiLV-C_SJP e CiLV-C_CRD

Para estabelecer o qPCR usando sondas de hidrólise foram desenvolvidos iniciadores e sondas específicas para o gene *RdRp* de ambas as estirpes. Com esse alvo é possível a detecção e quantificação simultânea de moléculas virais e antivirais do RNA1.

O programa PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) foi utilizado para a seleção das regiões alvos dos iniciadores e sondas. As condições de temperatura de anelamento para os iniciadores e sondas foram reajustadas utilizando o software Tm calculator (Promega, Madison, WI, EUA), considerando as condições específicas do Master Mix (Promega) utilizado nos ensaios (Tabela 2). O gene *SAND* de *Citrus x sinensis* L. (Osbeck). (GenBank ID 102625488) foi utilizado como gene de referência para normalizar os resultados entre as amostras (MAFRA et al., 2012).

Tabela 2. Relação das regiões alvos, fluoróforos e sequência dos iniciadores e sondas desenvolvidos para a quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C.

Região alvo	Reporter no 5'	Quencher no 3'	Tipo	Sequência	Tm	%GC	Amplicon (pb)
RdRp_SJP	HEX	BHQ-1	Iniciador 5'	TGTTAAGGCTGGTCTC	60	50	105
			Sonda	AAGTCATGTGCGGTTGGCA	70	53	
			Iniciador 3'	GATCCACGAGACGTT	60	53	
RdRp_CRD	FAM	BHQ-1	Iniciador 5'	GGTATATCAGTCTGCGAT	61	44	104
			Sonda	GGAGGTCGCGAAACTTGCTC	71	60	
			Iniciador 3'	AGTCAAGGAACTCATCTT	60	39	
SAND Citrus	Cy5	BHQ-3	Iniciador 5'	CGAGTAGTAGTGGGTATG	61	50	102
			Sonda	GAGAGAGAGGGAGCAGTAGCGA	62	60	
			Iniciador 3'	TTCCTGTATCCCATCATC	61	53	

5.7. Desenvolvimento de curva padrão para a quantificação absoluta das estirpes de citrus leprosis virus C utilizando RT-qPCR com sondas de hidrólise

Os fragmentos a serem usados nas curvas padrão dos ensaios RT-qPCR das duas estirpes foram gerados mediante RT-PCR (Tabela 3). Os amplicons correspondentes a cada região viral, 685 pares de base (pb) para SJP e 188 pb para CiLV-C_CRD, foram purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), ligados ao vetor pGEM- T-Easy, e transformadas em *E. coli* DH10B. Foi selecionada uma colônia para cada amplicon e os plasmídeos recombinantes foram confirmados por PCR. Essas colônias foram inoculadas em meio líquido LB (Luria Bertani) durante a noite em de agitação 150 rpm e temperatura de 37°C. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, EUA).

Tabela 3 Iniciadores utilizados para obter os amplicons para a curva padrão de RT-qPCR para CiLV-C.

	Sequência	Autores
Segmento da RdRp SJP	5': CCCATTTTCATCTCAAATAAAGGC	(RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016)
	3': CTAAATACCGCAGTTCCACC	
Segmento da RdRp CRD	5': AAGACCTCACAGTGATCCAG	CHABI-JESUS (não publicado)
	3': TTCCAAAGAGTCAAGGA ACT	

Como parte da preparação da curva padrão, os plasmídeos foram clivados com enzimas de restrição para obter moléculas lineares. Com esse tratamento, pretendeu-se simular a conformação linear dos genomas virais, distinta da circular típica dos

plasmídeos. Uma enzima de restrição que corta apenas num ponto do plasmídeo foi selecionada *in silico* utilizando Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A clivagem enzimática dos plasmídeos SJP e CRD foi feita utilizando *SacI* e foram obtidos, respectivamente, fragmentos de aproximadamente ~3200 pb e ~3700 pb.

Em paralelo, os fragmentos virais nos dois plasmídeos foram sequenciados nas duas direções. Uma vez confirmadas as identidades das sequências com aquelas dos genomas de referências (99% idênticas no caso de CiLV-C_SJP e 100% idênticas no caso de CiLV-C_CRD). O número de cópias do genoma foi calculado mediante a fórmula:

$$\text{Cópias}/\mu\text{L} = (\text{Concentração de plasmídeo (ng)} \times 6,02 \times 10^{23}) / (\text{Tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660 \times 10^9), \text{ onde } 6,02 \times 10^{23} \text{ se refere à constante de Avogrado e } 660 \times 10^9 \text{ ao peso molecular de um par de base em ng/mol.}$$

O ensaio da curva padrão foi analisado em triplicata e a eficiência dos iniciadores e o valor de Cq para cada reação foram determinados utilizando Real-Time PCR Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). O valor de eficiência de amplificação foi calculado utilizando a fórmula:

$$E=10^{(-1/S)} \text{ (S= slope do gráfico).}$$

Para o ensaio com sondas, 6 diluições seriadas a partir de 1 ng- 10⁻⁵ ng foram feitas com os plasmídeos recombinantes para montar a curva padrão.

5.8. Avaliação de especificidade e sensibilidade dos iniciadores em PCR

Com o intuito de caracterizar os iniciadores desenhados em 5.6, foi feita uma avaliação de especificidade e sensibilidade previamente ao RT-qPCR por sondas de hidrólise, utilizando PCR com diferentes pontos de diluição e temperatura.

Na preparação das misturas das reações foram utilizadas diluições dos dois DNAs plasmidiais SJP e CRD descritos em 5.7, respectivamente, com uma replicata de cada contendo 120 pg, 12 pg e 1,2 pg de plasmídeo. A amplificação foi feita utilizando o GoTaq G2 Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) utilizando os iniciadores descritos em 5.6. A especificidade dos iniciadores foi avaliada utilizando um gradiente com quatro temperaturas de anelamento. No ensaio para a detecção de vírus da estirpe SJP elas foram 54°C, 56°C, 58°C e 60°C, e no ensaio para CRD 55°C, 57°C, 59°C e 61°C.

5.9. Cálculo de eficiência de amplificação em RT-qPCR por fluoróforos intercalantes

Antes de realizar os ensaios com sondas de hidrólise, foi feita uma curva padrão para avaliar a eficiência de amplificação utilizando fluoróforos intercalantes.

As análises foram feitas utilizando 3 μ L de amostra, 5 μ L da reação do GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) e 200 nM dos iniciadores RdRp_SJP e RdRp_CRD. Os plasmídeos descritos em 5.7 foram utilizados em diluições de 1 ng até 10^{-7} ng para a construção da curva padrão. A reação foi realizada utilizando 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto e com estágio de curva de melting com 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto, 95°C por 30 segundos e 60°C por 15 segundos. Os dados gerados pelo foram analisados utilizando Real Time Miner (ZHAO; FERNALD, 2005).

5.10. Avaliação de interferência das sondas em RT-qPCR para as estirpes de CiLV-C

Os iniciadores foram feitos baseados em uma área da região da *RdRp* de CiLV-C, e como as estirpes de CiLV-C possuem aproximadamente 85% de identidade de nucleotídeos entre elas, foi realizado um estudo para identificar possíveis interferências quando a reação está com os dois sítios de anelamento.

Para identificar as possíveis interferências nos casos de detecção dos dois vírus em uma amostra com infecção mista, realizou-se um experimento com apenas uma sonda ou as duas sondas simultaneamente (ensaio multiplex) que detectam as linhagens de CiLV-C, além de um ensaio utilizando uma curva padrão em multiplex. Nos ensaios foram utilizados uma amostra com uma quantidade fixa de um plasmídeo contra uma diluição seriada do outro plasmídeo. No total foram realizados seis tratamentos para identificar interferência utilizando uma sonda e em multiplex. (i) plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP usando a sonda para detecção de CRD; (ii) plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex detectando CRD; (iii) plasmídeo SJP com 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD com apenas a sonda para SJP; (iv) plasmídeo SJP 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex detectando SJP; (v) plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex detectando SJP; (vi) plasmídeo SJP 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex detectando

CRD. Para as diluições citadas acima, foram utilizadas concentrações de plasmídeo de 1 ng a 10^{-7} ng.

5.11. Quantificação absoluta das estirpes de CiLV-C

Para detectar os vírus nos experimentos estabelecidos foi realizada RT-PCR nas folhas infectadas. Os extratos de RNA total foram obtidos utilizando-se Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por NanoDrop ND-8000 micro-spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a síntese do cDNA foi realizada como descrito no item 5.3. A PCR de detecção foi realizada com os iniciadores específicos para as duas estirpes que têm como alvo o gene *p24* (CHABI-JESUS et al., 2021).

As sondas de hidrólise foram sintetizadas e os ensaios se realizaram de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Madison, WI, EUA). Os ensaios foram conduzidos em duplicata no 7500 Fast Real-Time PCR System Device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras foram diluídas em seis partes de água livre de nuclease para uma parte de cDNA da amostra (6:1) e foram utilizados 3 μ L do diluído por reação. As análises foram feitas utilizando 5 μ L da reação do GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA) para fluoróforos intercalantes e GoTaq Probe qPCR Master Mix para o ensaio de sondas de hidrólise, 200 nM de concentração para os iniciadores RdRp_SJP e RdRp_CRD, e 250 nM para as sondas, o ciclo da reação foi 50°C por dois minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto.

Os valores de Cq de cada amostra foram calculados com o programa 7500 software[®] nas avaliações com sondas de hidrólise; para os ensaios com fluoróforos intercalantes para o normalizador de cada amostra foi utilizado o Real Time Miner (ZHAO; FERNALD, 2005). Na padronização do experimento usou-se o gene de referência *SAND* de *C. sinensis* (MAFRA et al. 2012).

Cinco tipos de análises foram feitos neste trabalho e envolveram 214 amostras de frutos, sendo 45 deles originários da Bahia (BA) e 169 do cinturão citrícola, além de 140 lesões de limbo foliar de *C. sinensis* coletadas de pomares não comerciais. Foram realizadas comparações na carga de CiLV-C em: (i) frutos e folhas advindos dos estados de SP-MG e BA de todas as variedades de laranja recebidas; (ii) frutos de todas

as variedades de copa recebidas de diferentes anos de coleta; (iii) estirpes presentes em frutos da BA e SP-MG em sete variedades de copa de laranja; (iv) frutos com CiLV-C_CRD em laranja 'Pêra' nos estados de SP-MG e BA; e (v) frutos das árvores de diferentes setores citrícolas do cinturão citrícola de SP-MG.

5.12. Análises estatísticas

Para avaliar se os dados possuem distribuição normal nos diferentes grupos foi utilizado o teste de normalidade Shapiro Wilk's Test. As análises estatísticas foram feitas seguindo cada particularidade dos experimentos de acordo com as cinco análises descritas em 5.11. (i) e (ii) No primeiro e no segundo experimentos foram feitos testes não paramétricos de Wilcoxon-Mann Whitney não pareados no programa R; (iii) no terceiro experimento foi feita uma avaliação com 5 grupos ou mais e foi utilizado o Teste Kruskal-Wallis; (iv) no quarto experimento foram utilizados os testes T não pareado e Mann-Whitney não pareado e (v) no quinto experimento foram utilizadas avaliações não paramétricas de Mann Whitney e Kruskal-Wallis. Todas as análises foram feitas no programa R (TEAM, 2020).

6. RESULTADOS

6.1. Alinhamento e comparação de sequências para definição dos iniciadores e sondas para RT-qPCR

Considerando o perfil de identidade de nucleotídeos revelado pelo SimPlot foi possível identificar uma região na ORF *RdRp*, com relativa baixa identidade entre as estirpes, que poderia ser útil na identificação e quantificação das estirpes de CiLV-C. A região de interesse escolhida encontra-se entre as posições ~2500~2600 nt e ~2200~2300 nt para SJP e CRD, respectivamente (Figura 8).

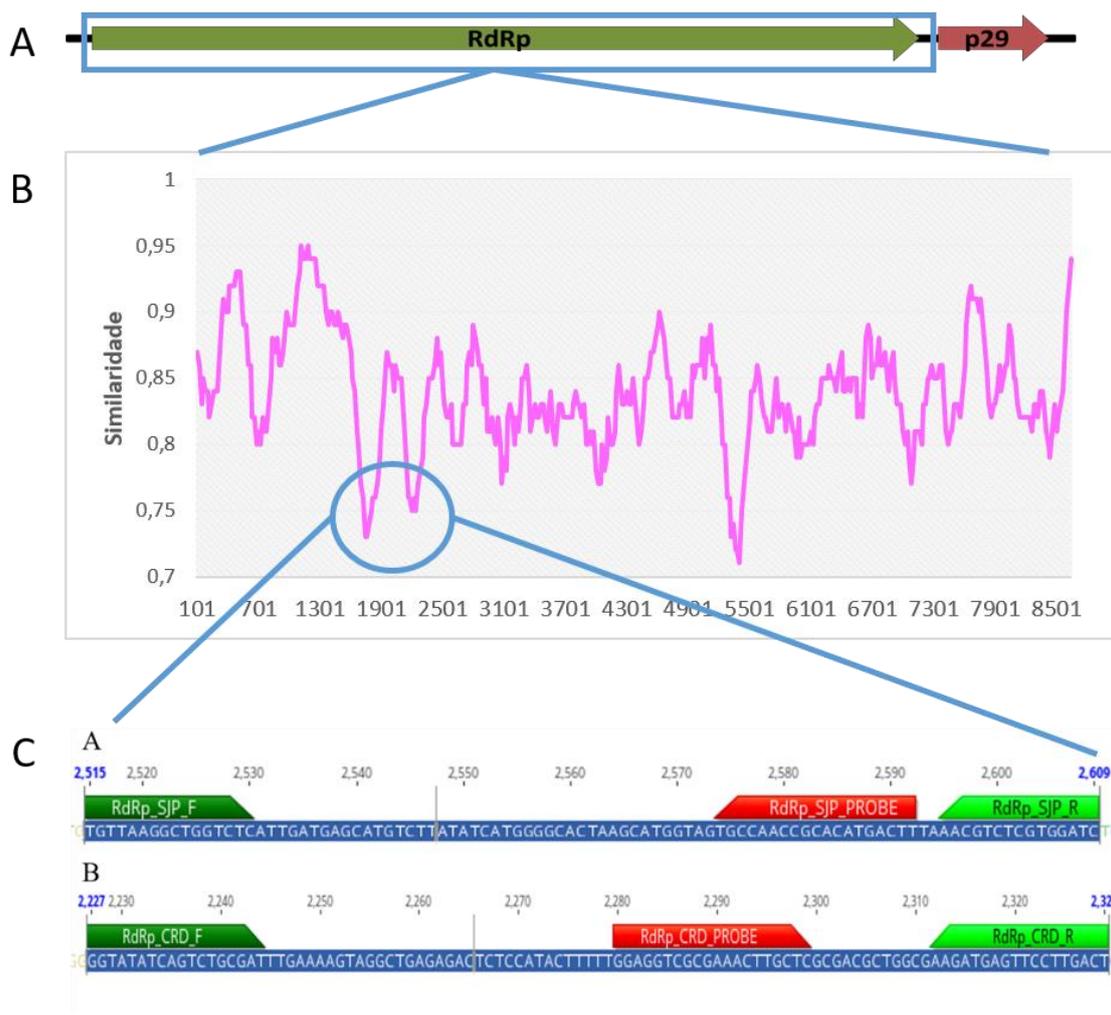


Figura 8 A: Genoma de de CiLV-C. **B**: Perfil de identidade do gene *RdRp* da estirpe CiLV-C_CRD com CiLV-C_SJP construído com o programa SimPlot. Eixo X: Posição dos nucleotídeos dentro da ORF. Eixo Y: Similaridade. **C**: Alinhamento do RNA 1 de CiLV-C com os iniciadores e sondas desenvolvidos para amplificar um segmento de *RdRp*. A: CiLV-C_SJP e B: CiLV-C_CRD.

No entanto, levando em conta a baixa quantidade de sequências disponíveis de CiLV-C_SJP, foi realizado um estudo de variabilidade genética da região genômica demarcada entre as posições ~2400 nt e 3100 nt do RNA1. Para isso, foram selecionadas 46 sequências parciais de isolados de SJP coletados em diferentes municípios ao longo dos anos. As sequências obtidas foram analisadas conjuntamente com cinco sequências de SJP e 13 de CRD (CHABI-JESUS et al., 2021) para um alinhamento múltiplo de sequências e detecção da presença de possíveis polimorfismos.

Para esse fim, a sequência de referência de SJP (GenBank acesso KP336747) foi utilizada para identificar SNPs na região da *RdRp*. Foi possível observar 12 SNPs dentro da área de anelamento dos iniciadores e sondas de *RdRp*_SJP, mas a

maior parte era pouco representativa dentro do grupo de amostragem. Apenas uma SNP na posição 8 do iniciador RdRp_SJP_R esteve representada em aproximadamente 10% dos haplótipos avaliados (5/51) (Tabela 4). O iniciador desenhado (GATCCACAAGACGTT) apresenta uma sequência que persegue a eficiência e a efetividade dos resultados com RT-qPCR.

Tabela 4 Frequência de SNPs dentro da região de anelamento de sondas e iniciadores específicos para a amplificação de parte da RdRp de CiLV-C_SJP.

Iniciadores e sondas RdRp_SJP			RdRp_SJP_F (Frequência de isolados que apresentam o SNP/total de isolados analisados)	RdRp_SJP_PROBE (Frequência de isolados que apresentam o SNP/total de isolados analisados)	RdRp_SJP_R (Frequência de isolados que apresentam o SNP/total de isolados analisados)
Sequência iniciadores e sondas			TGTTAAGGCTGGTCTC	AAGTCATGTGCGGTTGGCA	GATCCACGAGACGTT
Nº SNP	Município	Ano			
1	Cerqueira Cesar, SP	2017	<u>C</u> GTTAAGGCTGGTCTC (1/51)		
2	Olímpia, SP	2020		AAGTCATGTGCGG <u>A</u> TGGCA (1/51)	GA <u>C</u> CCACGAGACGTT (1/51)
3	Uru, SP	2019	TGT <u>C</u> AAGGCTGGTCTC (1/51)		
4	Uberaba, MG	2017		AAGTCATGTGC <u>A</u> GTTGGCA (1/51)	<u>G</u> GTTCCACGAGACGTT (3/51)
5	Ribeirão Bonito, SP	2018	TGTT <u>G</u> AGGCTGGTCTC (1/51)		
6	Altinópolis, SP	2018		AAGTC <u>G</u> TGTGCGGTTGGCA (1/51)	
7	Bauru, SP	2019	TGTTAAGGC <u>A</u> GGTCTC (1/51)	AAGTC <u>T</u> TGTGCGGTTGGCA (1/51)	
8	Limeira, SP	2019			GATCC <u>A</u> CAAGACGTT (5/51)
9	Lucianópolis, SP	2020			GATCC <u>A</u> CAAGACGTT (5/51)
10	Botucatu, SP	2020			GATCC <u>A</u> CAAGACGTT (5/51)
11	Trabiju, SP	2019			GATCC <u>A</u> CAAGACGTT (5/51)
12	Boa Esperança do Sul	2019		<u>G</u> AGTCATGTGCGGTTGGCA (1/51)	GATCC <u>A</u> CAAGACGTT (5/51)

6.2. Avaliação de especificidade e sensibilidade dos iniciadores através de um ensaio por PCR ponto final

Antes de dar continuidade com o ensaio com sondas, considerou-se necessário avaliar a especificidade dos iniciadores mediante um ensaio PCR ponto final. Isto é particularmente relevante no caso de sequências alvos com uma identidade nucleotídica elevada entre elas, como no caso das estirpes de CiLV-C.

Houve amplificação com os iniciadores RdRp_SJP apenas para a estirpe SJP na condição de temperatura de anelamento (TA) 56°C com uma banda forte na replicata com 120 pg, e amplificações mais fracas em 12 pg e 1,2 pg. A amplificação com os iniciadores RdRp_CRD apenas para a estirpe CRD ocorreu quando a TA atingiu 59°C com amplificação apenas nas replicatas de 120 pg e 12 pg. Em todos os grupos foi possível observar a intensidade da banda diminuindo de acordo com o maior fator de diluição dos plasmídeos SJP e CRD (Figura 9).

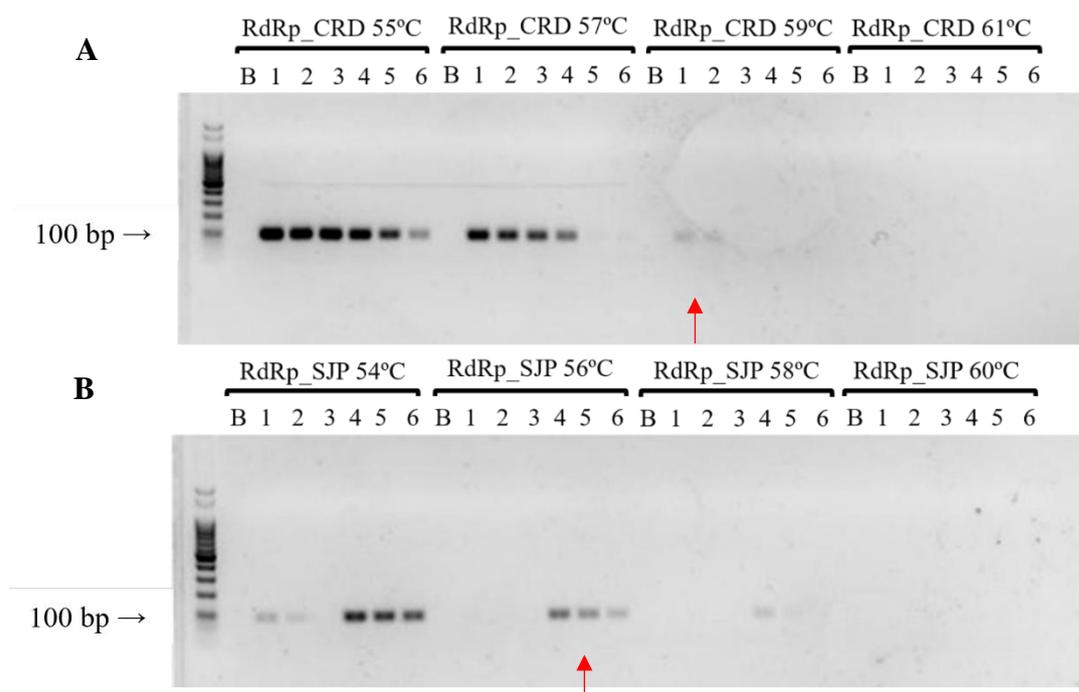


Figura 9 Gel de agarose (2%) de PCR com gradiente de temperatura e diferentes diluições das amostras. **A:** Iniciadores para CiLV-C_CRD. **B:** Iniciadores para CiLV-C_SJP. B: controle da PCR. 1 a 3: Amostra CiLV-C_CRD com 120 pg, 12 pg e 1,2 pg de DNA, respectivamente. 4 a 6: Amostra CiLV-C_SJP com 120 pg, 12 pg e 1,2 pg de DNA, respectivamente.

6.3. Ensaio em RT-qPCR com fluoróforos intercalantes com plasmídeos da curva padrão das estirpes de CiLV-C

Para aprofundar na caracterização dos iniciadores foram realizadas avaliações com uma curva padrão utilizando o sistema fluoróforos intercalantes GoTaq qPCR Systems (Promega, Madison, WI, EUA). Como no caso do PCR ponto final, o uso do ensaio qPCR fluoróforos intercalantes permitiria qualificar as regiões alvo e os iniciadores desenhados antes de realizar a síntese das sondas, consideradas o reagente

mais custoso do ensaio. As análises utilizaram as diluições seriadas dos plasmídeos recombinantes (linearizados) com os fragmentos alvos dos genomas das estirpes SJP e CRD.

As curvas padrão para SJP e CRD apresentaram um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 e as eficiências de amplificação (E) foram de 0,74 e 0,77 para SJP e CRD, respectivamente (Figura 10).

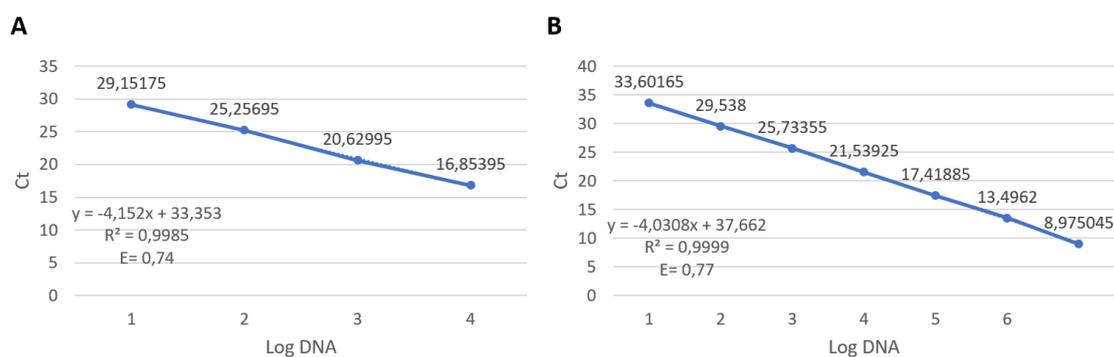


Figura 10 A: Curva padrão para CiLV-C_SJP por fluoróforos intercalantes; **B:** Curva padrão para CiLV-C_CRD por fluoróforos intercalantes. R^2 : Coeficiente de determinação. E: eficiência de amplificação. Y: Declínio

6.4. Desenvolvimento do ensaio RT-qPCR com sondas de hidrólise para a quantificação das estirpes SJP e CRD de CiLV-C

Baseado nos iniciadores usados nos ensaios com fluoróforos intercalantes e nas regiões alvos da amplificação, as sondas foram desenhadas pensando num ensaio multplex. Para isso, fluoróforos que absorvem e emitem em ondas de comprimento de luz diferentes foram utilizados para que não houvesse interferência na leitura durante a amplificação no 7500 Fast Real-Time PCR System Device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Como o fragmento gerado pelos iniciadores desenhados para a detecção diferencial das linhagens de CiLV-C por RT-qPCR se encontram numa área da *RdRp* que possui aproximadamente 85% de identidade de nucleotídeos, e os iniciadores *RdRp_CRD* possuem aproximadamente 80% de identidade em relação à sequência de CiLV-C_SJP e vice-versa, foram feitas avaliações para identificar se há interferência nas determinações quando colocados simultaneamente os dois plasmídeos ou em amostras com infecção mista das duas estirpes virais.

Nos ensaios onde é utilizado o plasmídeo de um vírus com uma diluição fixa, desafiado oito diluições do plasmídeo com a região do outro vírus e vice-versa (Figura 11, A-C), o Ct (Cycle threshold) varia ao menos cinco ciclos, utilizando a mesma quantidade de plasmídeo detectando SJP ou CRD. Em multiplex, quando o plasmídeo com 10^6 ng é desafiado com uma alíquota mais concentrada do outro plasmídeo, nas três primeiras alíquotas do concorrente não houve amplificação do plasmídeo com 10^6 ng (Figura 11, B-D). Consequentemente, dependendo da quantidade de DNA inicial na reação um plasmídeo interfere na detecção do outro, quando em multiplex.

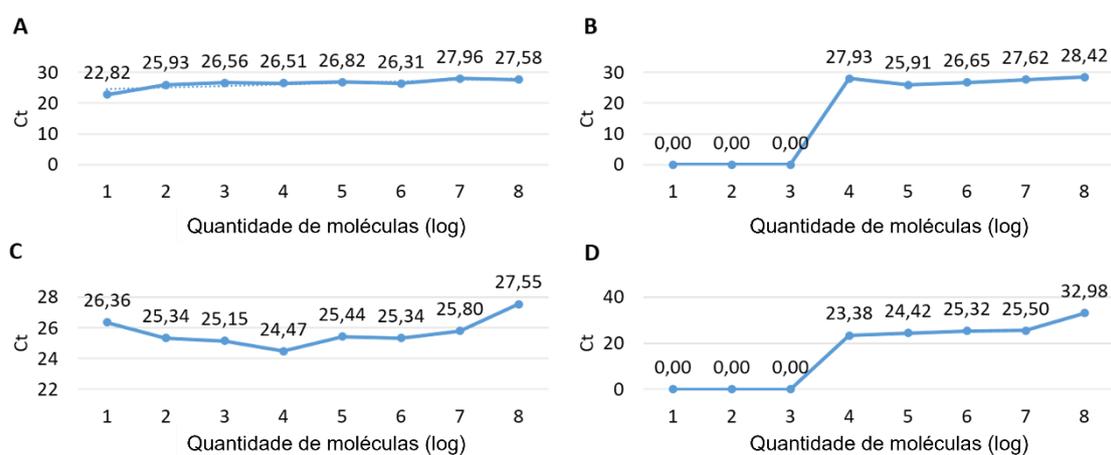


Figura 11 Tratamentos para identificar interferência utilizando uma sonda e em multiplex. Ct: Cycle threshold. Diluições de 1 ng a 10^{-7} ng. **A:** plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP detectando o plasmídeo CRD; **B:** plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex detectando CRD; **C:** plasmídeo SJP com 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD detectando apenas a sonda para SJP; **D:** plasmídeo SJP 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex com as duas sondas detectando SJP.

Para completar o ensaio que identifica possíveis interferências na detecção por multiplex, curvas padrão foram geradas utilizando um dos plasmídeos com o fragmento do vírus numa quantidade fixa e uma diluição seriada com o outro plasmídeo para simular uma infecção mista. As curvas padrão para as duas estirpes não obtiveram uma boa linha de tendência, com curva de regressão linear abaixo do normal $R^2: <0,90$. Por essa razão decidiu-se focar apenas na quantificação absoluta em infecções simples de leprose dos citros.

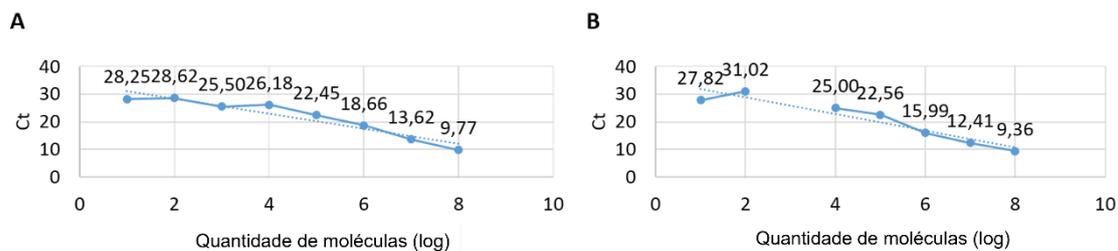


Figura 12 Curvas padrão geradas a partir dos tratamentos multiplex quando apenas uma sonda e em multiplex. Ct: Cycle threshold. Diluições de 1 ng a 10^{-7} ng. **A:** plasmídeo CRD 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo SJP em multiplex com as duas sondas detectando SJP; **B:** plasmídeo SJP 10^6 ng + 8 diluições do plasmídeo CRD em multiplex com as duas sondas detectando CRD.

Portanto, com a intenção de planejar o ensaio focado em infecções simples, os iniciadores e sondas foram utilizados nas proporções de 200 μ M e 250 μ M, respectivamente. Para as curvas padrão foram utilizadas diluições de 10^7 até 10^2 . O ciclo foi feito de acordo com o padrão do programa do 7500 Fast Real Time qPCR. O *Threshold* foi definido como ΔRn : 0,2 e 0,13 para CRD e SJP, respectivamente. A análise de regressão linear das curvas padrão revelou alto coeficiente de determinação ($R^2 = > 0,99$) e aumento na eficiência de amplificação para as sondas CRD (E: 1,07) e SJP (E: 0,92) com relação às eficiências observadas no ensaio com fluoróforos intercalantes (Figura 10).

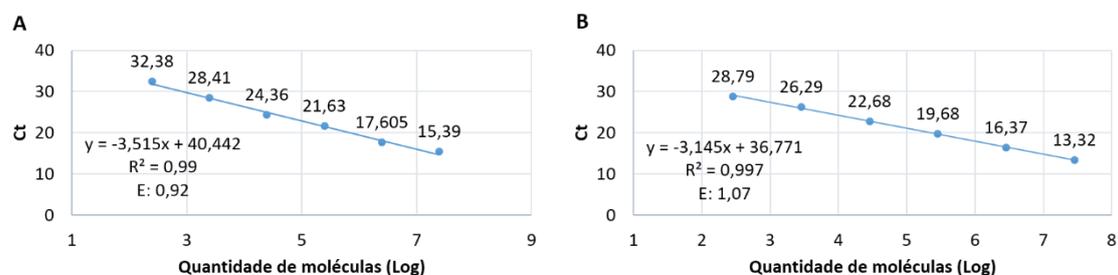


Figura 13 Curvas padrão obtidas utilizando plasmídeos recombinantes lineares com fragmentos da RdRp das estirpes de CiLV-C. **A:** Curva padrão para o CiLV-C_SJP. **B:** Curva padrão para o CiLV-C_CRD. **R²:** Coeficiente de determinação. **E:** Eficiência de amplificação. **Y:** Declínio

6.5. Acumulação das estirpes de CiLV-C no epicarpo de frutos e no limbo foliar de citros

A carga viral em lesões individuais de leprose em frutos e folhas de amostras coletados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia foi avaliada utilizando RT-qPCR utilizando as sondas. Com esta etapa, pretendeu-se obter uma fotografia da relação das estirpes SJP e CRD em condições de campo.

A lesões de frutos e folhas foram previamente avaliadas por RT-PCR ponto final para identificar a estirpe e direcionar as amostras para os ensaios específicos com sondas de hidrólise. Duzentas e quatorze amostras de frutos e 140 amostras de folhas coletadas entre 2017 e 2022, principalmente do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais e da Bahia, foram avaliadas para a detecção diferencial das estirpes de CiLV-C por RT-PCR ponto final. Para realizar a quantificação absoluta por RT-qPCR foram analisadas 214 dessas amostras (Tabela Suplementar 1). A acumulação viral de lesões com CiLV-C_CRD obteve aproximadamente 6 milhões de moléculas de vírus em média (\pm 1,6 milhões de moléculas de vírus), enquanto a acumulação de CiLV-C_SJP obteve aproximadamente 19 milhões de moléculas (\pm 2,8 milhões de moléculas de vírus) (Figura 14) quando comparando apenas por linhagem. Complementando os dados de carga viral dos frutos, 140 lesões individualizadas de leprose dos citros em folhas foram analisadas (Tabela Suplementar 2), determinando aproximadamente 3 milhões de moléculas de vírus (\pm 400 mil moléculas) para CiLV-C_SJP e 700 mil moléculas (\pm 88 mil moléculas) para CiLV-C_CRD (Figura 14). A carga viral de frutos e folhas revelou que nas duas linhagens a acumulação em folhas é aproximadamente 6 a 8 vezes menor do que em frutos.

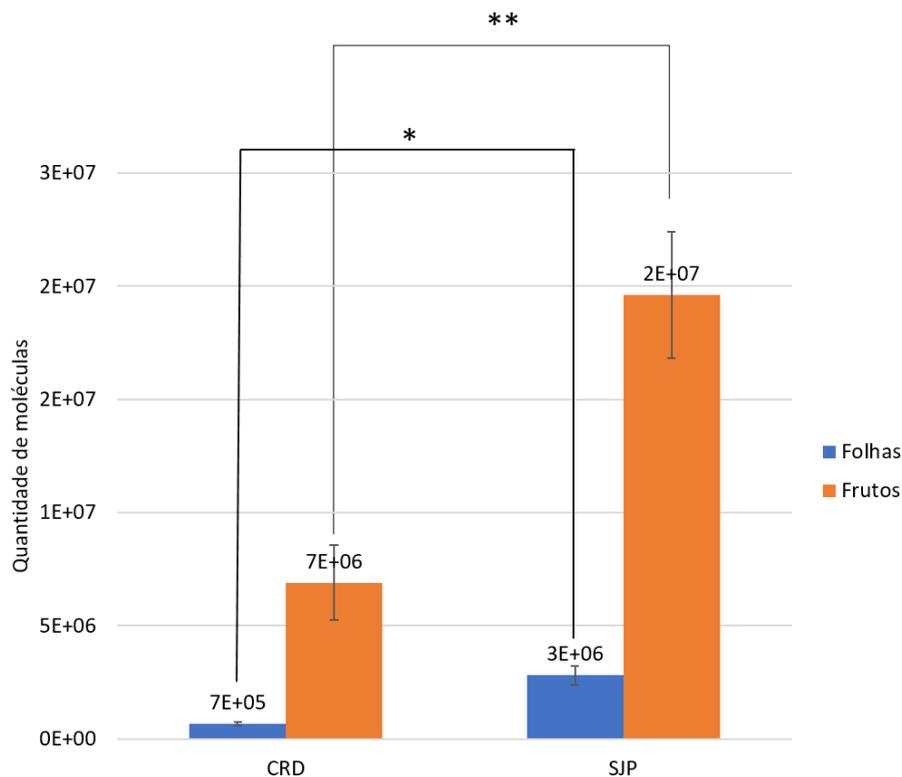


Figura 14 Média de carga viral das linhagens de CiLV-C de lesões individualizadas em frutos e folhas obtidas através de RT-qPCR por sondas de hidrólise. Avaliação estatística utilizada: Mann-Whitney. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005.

Amostras de frutos de todas as variedades coletadas dos anos 2020, 2018 e 2017 foram comparadas quanto à acumulação de CiLV-C_SJP e CRD. Essa análise poderia identificar inicialmente como as linhagens se comportaram ao longo das safras. Em 2020, as linhagens mostraram diferença na carga viral (CRD: 643 mil moléculas de vírus [+ 200 mil moléculas de vírus]; SJP: 6,5 milhões de moléculas de vírus [+ 2 milhões de moléculas de vírus]), porém a avaliação não foi estatisticamente significativa (Tabela Suplementar 3). Nas amostras de 2018 houve uma clara distinção entre as duas estirpes, com CiLV-C_SJP com ao menos 7,1 vezes mais carga viral que CRD (CRD: 5,88 milhões de moléculas [+ 1,8 milhões moléculas de vírus]; SJP: 41,9 milhões de moléculas [+ 6 milhões de moléculas de vírus]). Em 2017, CiLV-C_SJP foi ao menos 4 vezes maior que CRD (CRD: 3,16 milhões de moléculas de vírus [+ 2 milhões de moléculas de vírus]; SJP: 12,4 milhões de moléculas de vírus [+ 2 milhões de moléculas de vírus]) (Figura 15). Dessa forma, em todos os casos obteve-se maior acumulação para a estirpe CiLV-C_SJP, sendo que, no geral, CiLV-C_CRD exibe carga viral aproximadamente 60% menor em relação a CiLV-C_SJP.

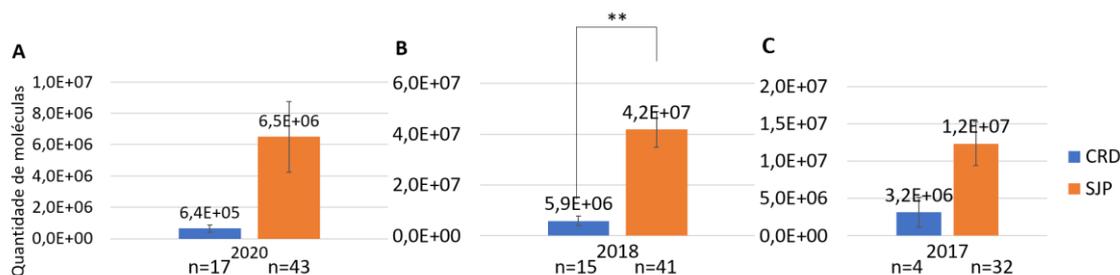
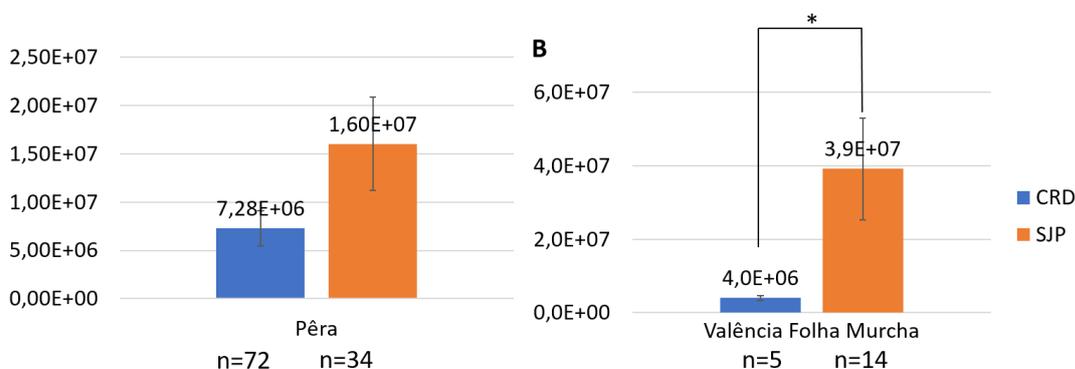


Figura 15 Média de carga viral das estirpes CRD e SJP de CiLV-C em lesões de leprose dos citros de acordo com os anos de coleta em frutos em **A**: 2020; **B**: 2018; **C**: 2017. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney*: p-value <0,05. **: p-value <0,005.

Para entender o comportamento do CiLV-C utilizando RT-qPCR para identificar a replicação viral nas principais variedades de copa de laranjeira em amostras de frutos foi realizado um estudo comparativo entre as duas estirpes para as variedades ‘Pêra’ e ‘Valência Folha Murcha’. Nos dois casos, CiLV-C_SJP manteve-se com carga viral de aproximadamente 2 vezes a 9 vezes maior que CiLV-C_CRD (‘Pêra’, CRD: 7,2 milhões de moléculas [+ 1,8 milhões de moléculas]; SJP: 16 milhões de moléculas [+ 4 milhões de moléculas]. ‘Valência Folha Murcha’, CRD 4 milhões de moléculas [+ 660 mil moléculas]; SJP: 39,2 milhões de moléculas [+ 13 milhões de moléculas]). Apenas na variedade de copa Laranja ‘Pêra’ não houve diferença estatística entre a carga viral entre as duas linhagens (Figura 16). Além de comparar o acúmulo das estirpes em diferentes variedades de copa, como o estado da Bahia e o cinturão citrícola de SP-MG possuem fatores edafoclimáticos distintos, foi comparada a acumulação viral de CiLV-C em Laranja ‘Pêra’ em amostras de frutos da Bahia e do cinturão citrícola apenas para a estirpe CRD, presente nas duas regiões. Os resultados revelaram que as amostras de laranja ‘Pêra’ que vieram da Bahia possuem pelo menos duas vezes maior acumulação viral em relação às amostras de SP-MG.



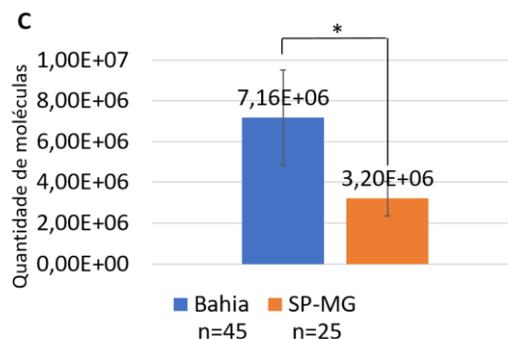


Figura 16 Comparação da média de quantidade de moléculas dos vírus das estirpes de CiLV-C obtidas através de RT-qPCR das variedades ‘Pêra’ e ‘Valência Folha Murcha’ analisadas em frutos. **A:** Comparação de acumulação viral entre as estirpes de CiLV-C na variedade de copa ‘Pêra’. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney. **B:** Comparação de acumulação viral entre as estirpes de CiLV-C na variedade de copa ‘Valência Folha Murcha’. Avaliação estatística utilizada: Teste T. **C:** Acumulação viral de CiLV-C_CRD em Laranja ‘Pêra’ no estado da Bahia e no cinturão citrícola SP-MG. Avaliação estatística utilizada: Teste Mann-Whitney. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005.

Sete variedades de copa foram avaliadas quanto à quantidade de moléculas de CiLV-C_SJP para identificar em qual variedade existe a maior acumulação do vírus. Dentre as variedades, ‘Natal’, ‘Valência Folha Murcha’ e ‘Pêra’ apresentam maior acumulação em relação às outras (‘Valência Folha Murcha’: 39,2 milhões de moléculas [+ 13 milhões de moléculas]; ‘Natal’: 30 milhões de moléculas [+ 8 milhões de moléculas]; ‘Pêra’: 16 milhões de moléculas [+ 4 milhões de moléculas]; ‘Valência’: 12,5 milhões de moléculas [+ 4 milhões de moléculas]; e ‘Hamlin’: 8,52 milhões de moléculas [+ 2 milhões de moléculas]). Embora haja diferença entre as variedades com mais carga viral em números totais, os dados não foram estatisticamente significativos (Figura 17).

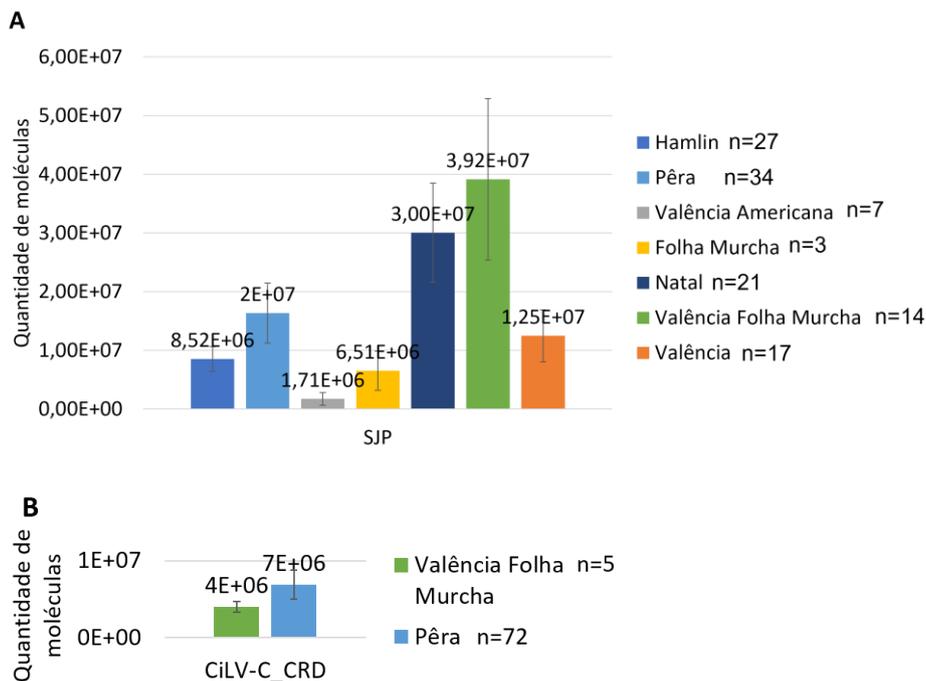


Figura 17 Média de quantidade de moléculas de CiLV-C_SJP de acordo com variedade de copa de laranja obtidas através da quantificação absoluta por RT-qPCR por sondas de hidrólise. **A:** Acumulação viral de CiLV-C_SJP nas variedades de copa analisadas. **B:** Acumulação viral de CiLV-C_CRD em Pêra e Valência Folha Murcha. Avaliação estatística utilizada: Teste Kruskal-Wallis.

Como o cinturão citrícola compreende diversas regiões do Estado de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais, essa área é dividida em setores, que possuem microclimas distintos (FUNDECITRUS, 2022a). Portanto, a acumulação das linhagens de CiLV-C foi avaliada nos diferentes setores do cinturão citrícola. Para a comparação entre as duas estirpes foi possível avaliar apenas amostras dos setores Centro e Sul devido ao baixo número de amostras com CiLV-C_CRD nas outras regiões. Apenas a linhagem SJP foi comparada entre os setores Noroeste, Norte, Centro, Sul e Sudoeste. Tendo em conta a maior parte das análises, CiLV-C_SJP manteve-se com maior acumulação viral em relação a CiLV-C_CRD. No Centro, CiLV-C_SJP obteve, em média, aproximadamente 23 milhões de moléculas (+/- 5 milhões de moléculas) enquanto CiLV-C_CRD atingiu a média de 1 milhão de moléculas (+/- 400 mil moléculas). No Sul, a acumulação de moléculas foi de aproximadamente 16 milhões para CiLV-C_SJP (+/- 4 milhões de moléculas) e 2 milhões para CiLV-C_CRD (+/- 600 mil moléculas) (Figura 18). Embora os setores Centro, Sul e Norte tenham maior acumulação em relação aos outros, estatisticamente elas não são diferentes, porém, com mais amostras de todos os setores, esses dados poderão se tornar mais robustos.

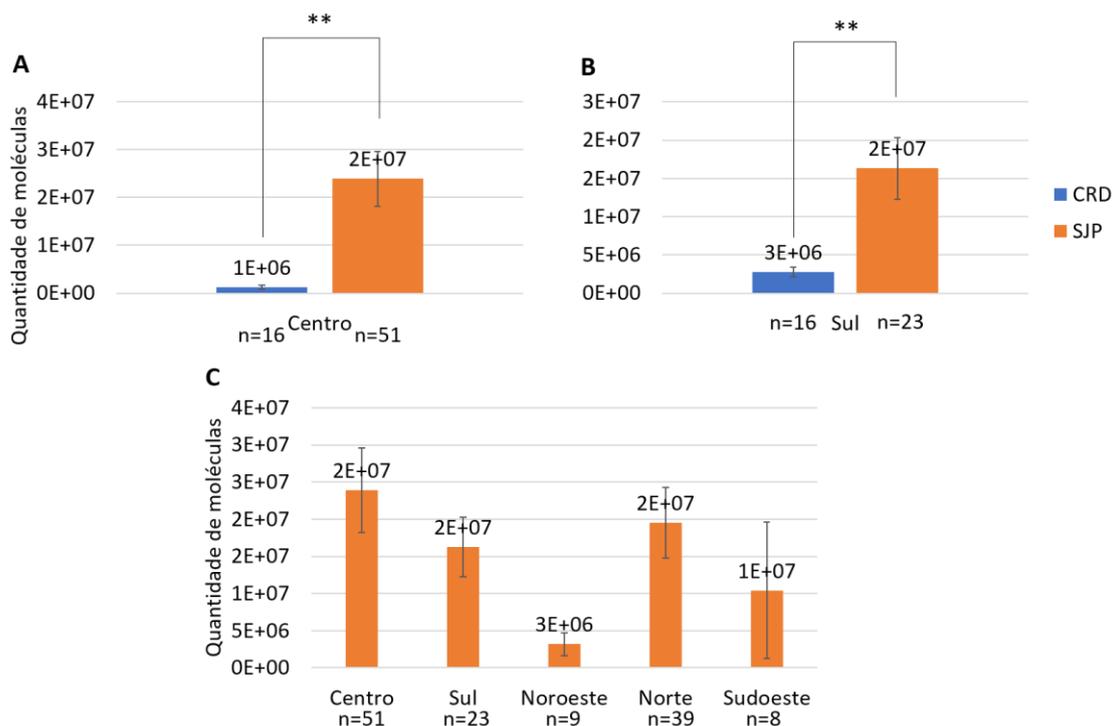


Figura 18 Média de acumulação viral das estirpes de CiLV-C de acordo com os setores do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais. **A:** Carga viral de CiLV-C_SJP e CRD no setor Centro. **B:** Carga viral de CiLV-C_SJP e CRD no setor Sul. **C:** Carga viral de CiLV-C_SJP nos setores citrícolas do Estado de São Paulo e Minas Gerais. *: p-value <0,05. **: p-value <0,005. Avaliações estatísticas utilizadas: Teste Mann-Whitney e Teste Kruskal-Wallis.

7. DISCUSSÃO

A taxa de queda de frutos associados diretamente à incidência de leprose dos citros na safra 2021-2022 bateu recorde histórico (FUNDECITRUS, 2021b). Em consequência, o prejuízo associado à doença acarretou em ≈R\$ 280 milhões (FUNDECITRUS, 2022a). A população de CiLV-C em plantios de citros está constituída pelas estirpes SJP e CRD (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Dados preliminares sobre a distribuição das estirpes de CiLV-C demonstraram que vírus da linhagem SJP são prevalentes no cinturão citrícola de SP-MG (CHABI-JESUS et al., 2021). Neste trabalho, aprofundamos no conhecimento sobre a relação citros-CiLV-C através da avaliação do acúmulo do RNA1 das estirpes SJP e CRD em infecções simples, quando só uma das estirpes está presente. Em conjunto com estudos sobre a relação das estirpes de CiLV-C com o seu vetor *Brevipalpus yothersi* (conduzidos pela bolsista PD Aline Tassi, processo FAPESP 2018/12252-8), nosso grupo procura explicar o motivo da distribuição assimétrica das estirpes de CiLV-C no cinturão citrícola. Com esse fim, primeiramente desenvolvemos um método baseado na RT-qPCR usando sondas de hidrólise para

quantificar a carga viral de cada uma das estirpes de CiLV-C em frutos e folhas de *C. sinensis* advindos dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia.

Existem métodos de detecção e quantificação por RT-qPCR para CiLV-C. Um deles usa a plataforma de sondas de hidrólise e tem como alvo o gene *mp* da estirpe CiLV-C_CRD (CHOUDHARY et al., 2015), e um outro, que usa fluoróforos intercalantes, detecta os ORFs *RdRp* e *p29* dos vírus da linhagem SJP (ARENA et al., 2020). Nenhum deles foi desenvolvido ponderando a detecção diferencial entre vírus das linhagens CRD e SJP. Além disso, nos casos em que os alvos são os genes *mp* e *p29*, a quantificação resulta na detecção simultânea da molécula de RNA que contém o genoma viral mais as das moléculas de RNA sub-genômicos geradas durante o ciclo de replicação. Por essas razões, neste trabalho desenvolvemos testes que têm como alvo exclusivamente o RNA genômico, especificamente a molécula do RNA1 das estirpes CRD e SJP. Os alvos foram escolhidos dentro da ORF *RdRp*, aproximadamente no mesmo locus nas duas estirpes, para evitar a detecção de RNA sub-genômicos e reduzir interferências de possíveis estruturas secundárias. No entanto, para a seleção dos iniciadores e sondas foi necessário levar em conta que as duas linhagens compartilham aproximadamente 85% de identidade de nucleotídeos, o que poderia ser a causa de ampliações inespecíficas ou heterólogas. Um outro alvo possível de detecção no RNA2 e que não produz RNA sub-genômicos é o gene *p15*, mas esse gene foi descartado considerando que as sequências de nucleotídeos nessa região genômica possuem mais de 95% de identidade entre isolados das duas linhagens (CHABI-JESUS et al., 2021).

Tendo em conta os desafios de identificar e, particularmente, quantificar sequências com relativa alta identidade nucleotídica entre elas, neste trabalho realizamos testes sequenciais e em diferentes plataformas para determinar a performance dos iniciadores desenhados. Assim, os diferentes parâmetros avaliados, que incluíram avaliações em PCR, RT-qPCR com fluoróforos intercalantes, e RT-qPCR usando sondas de hidrólise em uma reação multiplex, permitiram reconhecer que embora os iniciadores sejam eficientes para quantificar os alvos indicados, não podem ser utilizados em ensaios de quantificação quando os vírus se encontram em infecções mistas. As diferentes etapas de avaliação revelaram que em condições de $TA < 56^{\circ}C$, ou em alta concentração dos alvos (120 pg), os iniciadores não puderam discernir entre as linhagens, provavelmente por fenômenos de interferências decorrentes da relativamente alta identidade de nucleotídeos entre os alvos. Entretanto, conseguiu-se uma condição na qual o

desempenho dos iniciadores foi satisfatório para quantificar vírus em infecções simples em lesões individualizadas do epicarpo de frutos e do limbo foliar de laranjeiras.

As análises de 354 amostras (140 folhas e 214 frutos) demonstraram que, independentemente dos anos da coleta e das variedades analisadas, os vírus da linhagem SJP possuem ao menos três vezes maior acumulação em relação ao CRD, com a chance de chegar em até 10 vezes. A acumulação dos vírus na planta, ou em diferentes tecidos pode ter implicações diretas na transmissão pelo ácaro. Não existem evidências concretas sobre a multiplicação de CiLV-C nos ácaros (TASSI et al., 2022) e a hipótese mais aceita indica que a transmissão do vírus é do tipo persistente circulativo não-propagativo (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003; TASSI et al., 2017, 2022). Mantendo essa linha de raciocínio, vírus das estirpes que alcançarem maior carga viral na célula vegetal seriam adquiridos preferencialmente e teriam maior vantagem na hora da inoculação pelo ácaro, sem depender exatamente da sua propagação dentro do vetor.

Ainda que a diferença de distribuição entre as linhagens de CiLV-C possa estar relacionada com a interação desigual das estirpes com o seu hospedeiro principal, i.e. *C. sinensis*, outros fatores, embora provavelmente estejam interligados com a carga viral na célula vegetal, podem contribuir com esse comportamento. Experimentos preliminares sugerem que populações distintas do ácaro *B. yothersi* podem interagir de modo desigual com as linhagens virais (TASSI et al., 2021). A maior eficiência de transmissão, nesses ensaios, correspondeu a vírus da estirpe CiLV-C_SJP (eficiência de transmissão: 31,4 a 77,9% para SJP, e 18,6 a 56% para CRD), o que poderia indicar possíveis vantagens adaptativas. A interação desigual entre cilevirus e dichorhavirus com os seus vetores têm sido descritas entre as causas prováveis da mudança na epidemiologia de CiLV-C na Colômbia. Ácaros *Brevipalpus* virulíferos coletados no campo transmitiram CiLV-C2 e OFV_citrus a plântulas de laranjeiras doces, mas CiLV-C não foi detectado nessas plantas, embora sua presença no pool de ácaros usados nos experimentos tenha sido previamente confirmada. A ausência de CiLV-C nas plantas foi considerada como consequência de sua menor eficiência de transmissão, o que poderia ser a causa da substituição desse vírus pelo CiLV-C2 observado naquele país (ROY et al., 2012, 2015). Tendo em vista os dados da distribuição das linhagens de CiLV-C no cinturão citrícola e os eventos descritos na Colômbia, existe a possibilidade, ao menos nos estados de São Paulo e Minas Gerais, de que CiLV-C_SJP esteja substituindo CiLV-

C_CRD, provavelmente, em consequência de atingir maior acumulação viral e/ou interagir melhor com o ácaro vetor (Figura 14).

Além da desigual acumulação viral no vetor provavelmente devido as diferentes cargas virais adquiridas durante a alimentação na planta, diferenças nas glicoproteínas dos vírus podem modificar a interação destes com o vetor. Esse fator pode ser mais evidente no caso de transmissão propagativa, mas poderia ser importante para transmissões circulativas não-propagativas, como é possível que seja na interação CiLV-C-*B. yothersi*. O cytorhabdovírus lettuce necrotic yellows virus (LNYV) possui duas principais estirpes: SI e SII. Estudos sobre as glicoproteínas e a glicosilação destas proteínas em cada estirpe evidenciaram diferenças conformacionais que dão suporte às evidências de que SII poderia ter maior eficiência de transmissão do vetor e maior taxa de replicação no seu hospedeiro ou em seus insetos vetores na Austrália e na Nova Zelândia (PRABOWO et al., 2022). Dentro do sistema de CiLV-C, a proteína P61 dos cilevírus também é uma possível glicoproteína (FREITAS-ASTÚA et al., 2018; ARENA et al., 2020), com aproximadamente 84% de identidade de aminoácidos entre a P61 das estirpes SJP e CRD (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016). Consequentemente, essa diferença poderia conferir uma interação diferente com o hospedeiro e/ou vetor, com o vírus da linhagem SJP sendo favorecido.

Durante esse trabalho foi estimada a quantificação absoluta de vírus das linhagens CRD e SJP em dois órgãos de laranjeiras: o epicarpo dos frutos e o limbo foliar. Nos frutos, as cargas virais das duas linhagens foram aproximadamente nove vezes maiores que em folhas (Figura 14), o que poderia representar um outro fator a contribuir com a epidemiologia assimétrica das estirpes de CiLV-C no cinturão citrícola de SP-MG. Um estudo sobre o ciclo de vida de ácaros do gênero *Brevipalpus* coletados em pomares das variedades ‘Valência’ e ‘Pêra’ infectados por leprose revelou que existe uma preferência da ovoposição pelos frutos (CHIAVEGATO, 1986). No entanto, nesses experimentos não se determinou os efeitos da presença do vírus na biologia do ácaro. Como os frutos mostraram ser melhor substrato que folhas para os ácaros, essa característica, em conjunto com acumulação de CiLV-C mais alta em frutos, poderia sustentar a ideia de que ácaros que se alimentam de frutos infectados com leprose dos citros seriam favorecidos a adquirir maior quantidade de vírus e ter maior eficiência na transmissão. Consequentemente, essa característica molecular pode servir para fortalecer

uma medida profilática já utilizada para reduzir os impactos da leprose dos citros, ou seja, a eliminação dos frutos temporãos de talhões com leprose.

Nossos resultados também sugerem que as cargas virais atingidas pelo CiLV-C são influenciadas pelas variedades de *C. sinensis* usadas na copa das árvores. Para ‘Valência Folha Murcha’, por exemplo, houve maior acumulação dos vírus da linhagem SJP. Na variedade ‘Pêra’, embora seja perceptível uma tendência de maior acumulação de CiLV-C_SJP que CRD, os valores de carga viral entre amostras infectadas por cada uma das duas linhagem não foram estatisticamente significativos (Tabela Suplementar 3) (Figura 17). Observando o estudo de carga viral da estirpe SJP em variedades de copa é possível identificar que talvez exista uma correlação entre a carga viral e a maturação das variedades. Deve ser levado em consideração que a coleta dessas amostras foi feita no mesmo período (entre março e abril) durante a estimativa de safra do PES (Pesquisa de Estimativa de Safra), e essa colheita compreendeu diversas variedades de copa entre precoces e tardias. As variedades mais tardias (Natal e Folha murcha) apresentaram cargas maiores do vírus enquanto variedades mais precoces (Hamlin e Valência Americana) apresentaram cargas menores (Figura 17). A diferença de carga viral de SJP e CRD em variedades de copa poderia estar relacionada com mudanças na fisiologia do fruto de acordo com os estágios de maturação, porém uma avaliação com maior número de amostras de todas as variedades e com diferentes estágios de maturação será necessária para criar dados mais robustos.

Entre as amostras com CRD, a carga viral foi superior nas árvores com copa da variedade ‘Pêra’. Um estudo com dez variedades de citros, no qual se analisou a susceptibilidade à leprose dos citros baseado na quantidade de frutos com lesões, sugeriu que a variedade Pêra poderia ser mais suscetível à doença (RODRIGUES, 2000). Mesmo que na hora de estimar a suscetibilidade das variedades cítricas a CiLV-C a carga viral não possa ser comparada equitativamente com o número de lesões, os resultados de ambos os experimentos revelam uma interligação cujo fator comum determinante poderia ser o grau de suscetibilidade do hospedeiro as estirpes virais analisadas. Das variedades nas quais foi possível comparar estatisticamente os valores de carga viral, os dados apontam que as árvores de copa ‘Pêra’ possuem maior carga dos vírus da linhagem CRD, corroborando dados de literatura que evidenciam maior número de lesões nos frutos dessa variedade (RODRIGUES, 2000). Porém, os resultados das análises deste trabalho devem ser tomados como preliminares e só como uma referência para as próximas etapas dos

estudos. Por outro lado, no caso do experimento de suscetibilidade avaliando-se apenas lesões nos frutos (RODRIGUES, 2000), não é possível reconhecer a linhagem de CiLV-C usada no experimento. Em busca de maior precisão, a avaliação da carga viral num maior número de amostras será uma necessidade para obter resultados mais conclusivos sobre a relação vírus-hospedeiro.

A distribuição varietal na citricultura na Bahia e no cinturão citrícola SP-MG é heterogênea. Em SP-MG as variedades ‘Pêra’ e ‘Valência’ representam ~35% e 20%, respectivamente, do total de plantas adultas dentro do cinturão citrícola, (FUNDECITRUS, 2022b). Já no estado da Bahia, ~80% dos pomares possuem árvores com copa da variedade ‘Pêra’¹. A comparação entre as linhagens de CiLV-C demonstrou que SJP e CRD possuem carga viral semelhante nesta variedade. Neste trabalho foi feita uma avaliação com a carga viral na variedade ‘Pêra’ das duas áreas. Os resultados demonstraram que nas plantas do estado da Bahia, CiLV-C_CRD possui aproximadamente o dobro de acumulação viral em relação a amostras de SP-MG (Figura 16). Por isso, é essencial ter em vista que fatores como temperatura média podem afetar a epidemiologia da doença (BIERAS; SANTOS, 2004). Tanto a temperatura como a composição varietal poderiam ser alguns dos motivos pelos quais ainda não tenha acontecido o processo de substituição de CRD por SJP na Bahia. Ao mesmo tempo, os dados são importantes para programas de melhoramento utilizando variedades de copa mais resistentes à leprose dos citros, pois evidenciam a necessidade de avaliar os genótipos para as diferentes estirpes virais.

O estado de São Paulo possui aproximadamente 248 mil km² e abriga climas tropicais e temperados; dentre eles, abriga ao menos oito microclimas de acordo com a classificação de Köppen (XAVIER; BLAIN; MORAIS, 2020). Em consequência, parâmetros da biologia do ácaro e a epidemiologia da leprose dos citros podem ser afetados diferencialmente ao longo dos setores citrícolas. Nesse trabalho, a acumulação viral nas amostras foi avaliada de acordo com os setores citrícolas dos estados de São Paulo e sudoeste de Minas Gerais. A quantidade viral foi comparada entre as duas linhagens em diferentes municípios dos setores Centro e Sul, contudo não foi possível fazer a comparação em outros setores devido ao baixo número de amostras infectadas

¹ <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/citricultura/anos-anteriores/panorama-da-citricultura-na-bahia/view>

com vírus da linhagem CRD. Nos setores avaliados, CiLV-C_SJP alcançou uma carga viral de ao menos nove vezes maior que CRD. No caso da linhagem SJP, a carga viral foi estudada nas árvores dos setores Centro, Norte, Sul, Sudoeste, Noroeste. Embora análises mais aprofundadas e com maior número de amostras precisam ser conduzidas, com os dados existentes não é possível observar uma tendência de maior acumulação viral nas árvores dessas regiões (Figura 19).

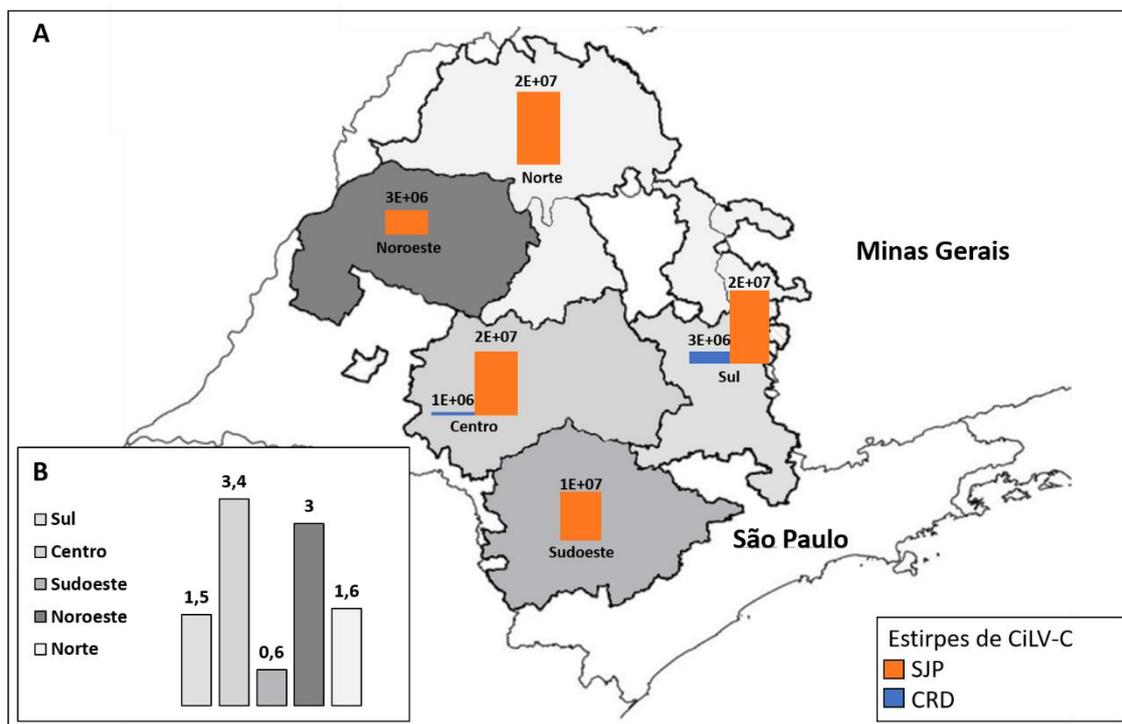


Figura 19 A: Distribuição geográfica dos setores citrícolas dos estados SP e MG. As barras representam a acumulação viral das estirpes de CiLV-C. **B:** Taxa de queda de frutos (%) causados pela leprose dos citros nas áreas do cinturão citrícola, modificada de (FUNDECITRUS, 2022a).

Nesse trabalho foi desenvolvido um sistema de quantificação viral utilizando sondas de hidrólise para quantificar as estirpes de CiLV-C em infecções simples. Apesar de não ser possível obter total especificidade utilizando sondas de hidrólise para detectar diferencialmente as estirpes de leprose dos citros em infecções mistas, com o auxílio do PCR para a prévia detecção das estirpes, foi possível avaliar a acumulação de CiLV-C. Como resultado da quantificação absoluta de CiLV-C, obteve-se informações sobre a carga viral desigual das linhagens de CiLV-C entre os tecidos do epicarpo dos frutos e no limbo foliar e entre variedades de laranjeiras doces. Os dados obtidos provavelmente revelam uma manifestação biológica direta das divergências existentes ao nível genômico entre as estirpes CiLV-C_SJP e CiLV-C_CRD, e podem ser

uma das premissas para compreender o comportamento epidemiológico da população de CiLV-C. Do ponto de vista prático, os dados obtidos podem oferecer subsídio no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético de citros contra a leprose. Espera-se, que técnicas de detecção mais avançadas baseadas no sistema CRISPR-Cas (KIM; JI; KOH, 2021) poderiam ajudar a decifrar as interações entre as estirpes no contexto de uma infecção mista.

8. CONCLUSÕES

- (i) O ensaio com sondas de hidrólise obteve desempenho satisfatório para infecções simples, no entanto, não foi possível realizar detecção em infecções mistas;
- (ii) As linhagens de CiLV-C têm acumulação diferente entre elas, sendo que SJP alcança de três a seis vezes maior carga viral que CRD;
- (iii) A carga viral das linhagens de CiLV-C em frutos é ao menos oito vezes maior que em folhas;
- (iv) CiLV-C_SJP pode se acumular diferentemente de acordo com a variedade de copa infectada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENA, G. D. et al. 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, p. 1757, 2016.
- ARENA, G. D. et al. 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, p. 1–20, 2020.
- BASSANEZI, R. B. et al. 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. et al. Citrus leprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 284–292, 2010.
- BASTIANEL, M. et al. Citrus leprosis resistance within the citrus group. **VirusDisease**, v. 29, n. 4, p. 491–498, 2018.
- BIERAS, A.; SANTOS, M. dos. Influência climática na incidência do ácaro da leprose (*brevipalpus phoenicis*) na citricultura dos municípios de Limeira e Bebedouro (SP). **Geosul**, v. 19, n. 37, p. 95–114, 2004.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513–1523, 1979.
- BITANCOURT, A. A leprose dos citros. **O Biológico**, v. 6, n. 2, p. 39–45, 1940a.

- BITANCOURT, A. A podridão das radículas dos Citros na província de Corrientes, Argentina. **O Biológico**, v. 6, p. 356–364, 1940b.
- CALEGARIO, R. F. et al. Polyclonal antibodies to the putative coat protein of Citrus leprosis virus C expressed in *Escherichia coli*: Production and use in immunodiagnosis. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 188–197, 2013.
- CHABI-JESUS, C. et al. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease**, p. PDIS-09-17-1425-RE, fev. 2018a.
- CHABI-JESUS, C. et al. 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, ago. 2018b.
- CHABI-JESUS, C. et al. 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, 2021.
- CHIAVEGATO, L. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 8, p. 813–816, 1986.
- CHOUDHARY, N. et al. Production of monoclonal antibodies for detection of Citrus leprosis virus C in enzyme-linked immuno-assays and immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 206, p. 144–149, 2014.
- CHOUDHARY, N. et al. Detection of Citrus leprosis virus C using specific primers and TaqMan probe in one-step real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Virological Methods**, v. 224, p. 105–109, 2015.
- CHOUDHARY, N. et al. Production of mono- and polyclonal antibodies to Citrus leprosis virus C2 and their application in triple antibody sandwich ELISA and immunocapture RT-PCR diagnostic assays Author's Personal Copy Production of mono- and polyclonal antibodies to Citrus. n. February, 2017.
- COSTA, A. S.; MULLER, G. W. Tristeza control by cross protection: a US-Brazil cooperative success. **Plant Disease**, v. 64, p. 538–541, 1980.
- CRUZ-JARAMILLO, J. L. et al. 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, 2014.
- DE LILLO, E. et al. Phytophagous mites transmitting plant viruses: update and perspectives. **Entomologia Generalis**, v. 41, n. 5, p. 439–462, out. 2021.
- FAWCETT, H. S. Scaly bark or nail-head rust of citrus. **Bulletin. Florida Agricultural Experiment Station**, n. 106, p. 3–41, 1911.
- FREITAS-ASTÚA, J. et al. Brevipalpus-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion in Virology**, v. 33, p. 66–73, 2018.
- FUNDECITRUS. **Safra de laranja 2020/21 se encerra em 268,63 milhões de caixas / 2020-21 Final orange crop forecast update**. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202021-se-encerra-em-26863-milhoes-de-caixas--2020-21-final-orange-crop-forecast-update/1020>>. Acesso em: 12 nov. 2021a.

FUNDECITRUS. **Taxa de queda de frutos bate recorde na safra 2020/2021 de citros.** Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/noticias/taxa-de-queda-de-frutos-bate-recorde-na-safra-2020-2021-de-citros>>.

FUNDECITRUS. Fechamento da Safra de Laranja 2021/2022. 2022a.

FUNDECITRUS. **ESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA PARQUE CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO.** Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>>. Acesso em: 8 jul. 2022b.

GARCÍA-ESCAMILLA, P. et al. 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.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

KIM, S.; JI, S.; KOH, H. R. biomolecules CRISPR as a Diagnostic Tool. 2021.

KITAJIMA, E. W.; ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Bevipalpus* mites (Tenuipalpidae) – Economically important plant virus vectors. Part 7. Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus* transmitted viruses. **Zoologica**, v. 160, p. 174–192, 2014.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; RODRIGUES, J. C. V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental & applied acarology**, v. 30, n. 1–3, p. 135–60, 2003.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental & applied acarology**, v. 30, n. 1–3, p. 215–23, 2003.

KUHN, J. H. et al. 2021 Taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Archives of Virology**, 2021.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LEASTRO, M. O. et al. Citrus Leprosis Virus C Encodes Three Proteins With Gene Silencing Suppression Activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–16, 2020.

LEASTRO, M. O. et al. Unravelling the involvement of cilevirus p32 protein in the viral transport. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.

LEÓN, M. G. et al. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the citrus leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease**, v. 92, n. 9, p. 1364–1364, 2008.

LOCALI-FABRIS, E. C. et al. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 9, p. 2721–2729, 2006.

LOCALI, E. C. et al. Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas. **Plant Disease**, v. 87, n. 11, p. 1317–1321, fev. 2003.

LOLE, K. S. et al. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype

- Recombination. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 152–160, 1999.
- MAFRA, V. et al. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- MELZER, M. J. et al. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Archives of virology**, 2013.
- MOREIRA, R. R. et al. Impact of diseases and pests on premature fruit drop in sweet orange orchards in São Paulo state citrus belt, Brazil. **Pest Management Science**, v. 78, n. 6, p. 2643–2656, 2022.
- MUSHEGIAN, A. R.; ELENA, S. F. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. **Virology**, v. 476, p. 304–315, 2015.
- NUNES, M. A. et al. Citrus leprosis virus C naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of citrus orchards in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 770–770, 2012.
- NUNES, M. A. et al. First report of *Brevipalpus papayensis* Baker (Acari: Tenuipalpidae) as vector of Coffee ringspot virus and Citrus leprosis virus C. **Plant Disease**, 2018.
- OLMEDO-VELARDE, A. et al. 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**, p. 1, 2021.
- OLMEDO-VELARDE, A.; HU, J.; MELZER, M. J. A Virus Infecting Hibiscus *rosasinensis* Represents an Evolutionary Link Between Cileviruses and Higreviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 988, maio 2021.
- PASCON, R. C. et al. The complete nucleotide sequence and genomic organization of citrus leprosis associated virus, cytoplasmatic type (CiLV-C). **Virus genes**, v. 32, n. 3, p. 289–98, 2006.
- PASSOS, O. **A Citricultura no Mundo e no Brasil**. [s.l: s.n.]v. 66
- PRABOWO, E. Y. et al. Is the Glycoprotein Responsible for the Differences in Dispersal Rates between Lettuce Necrotic Yellows Virus Subgroups? **Viruses** **2022**, Vol. 14, Page 1574, v. 14, n. 7, p. 1574, 20 jul. 2022.
- QUITO-AVILA, D. F.; FREITAS-ASTÚA, J.; MELZER, M. J. Bluner-, Cile-, and Higreviruses (Kitaviridae). **Encyclopedia of Virology**, p. 247–251, 2021.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L. et al. Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of Citrus leprosis virus C. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 1–25, 2016.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L. et al. Citrus leprosis virus N: A New Dichorhavirus Causing Citrus Leprosis Disease. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 963–976, 2017.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L. et al. Citrus leprosis: a unique multietiological disease. **Citrus in the Americas**, v. 1, n. 1, p. 4–19, 2018.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L. et al. 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, p. 206, 2020.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P. L. et al. A Novel Lineage of Cile-Like Viruses Discloses the Phylogenetic Continuum Across the Family Kitaviridae. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. March, 2022.

RODRIGUES, J. C. V. **RELAÇÕES PATÓGENO - VETOR- PLANTA NO SISTEMA LEPROSE DOS CITROS**. 2000. USP, 2000.

ROY, A. et al. A Novel Virus of the Genus Cilevirus Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 488–500, 2012.

ROY, A. et al. First Report of Citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. **Plant Disease**, v. 98, n. 8, p. 1162, 2014.

ROY, A. et al. Role bending: Complex relationships between viruses, hosts, and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 1013–1025, 2015.

ROY, A. et al. 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, 2018.

RUBIO, L.; GALIPIENSO, L.; FERRIOL, I. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1092, jul. 2020.

TASSI, A. D. et al. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 3, p. 227–241, 2017.

TASSI, A. D. et al. TRANSMISSÃO DIFERENCIAL DE ESTIRPES DE CITRUS LEPROSIS VIRUS C POR SUBPOPULAÇÕES DE *Brevipalpus yothersi*. In: **Anais...Congresso Nacional de Fitopatologia**, 2021.

TASSI, A. D. et al. Circulative Transmission of Cileviruses in *Brevipalpus* Mites May Involve the Paracellular Movement of Virions. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. April, 2022.

TEAM, R. C. **A language and environment for statistical computing. Foundation of Statistical Computing** Vienna, 2020. .

WEEKS, A. R.; MAREC, F.; BREEUWER, J. A. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, v. 292, n. 5526, p. 2479–2482, 2001.

XAVIER, A. C. F.; BLAIN, G.; MORAIS, M. V. B. **Probability of Extreme Rainfall Events Based on Different Greenhouse Gases Emission Rates : a Flexible Non-Linear Management of Agri-Environmental Resources Probability of Extreme Rainfall Events Based on Different Greenhouse Gases Emission Rates : a Flex**. 2020. 2020.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY**, v. 12, n. 8, 2005.

10. TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 Amostras de frutos com leprose dos citros utilizados para a quantificação absoluta das linhagens de CiLV-C

Frutos										
CRD					SJP					
Número da amostra	Local de coleta	Setor Citrícola	Ano de coleta	Variedade	Número da amostra	Local de coleta	Setor Citrícola	Ano de coleta	Variedade	
4 (6)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	6	Botucatu, SP	Sudoeste	2020	Natal	
2 (2)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	147	Cajobi, SP	Norte	2020	Natal	
4 (B2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	88	Onda Verde, SP	Norte	2020	Valência	
1 (B3)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	11	Ribeirão Bonito, SP	Centro	2020	Valência	
2 (B3)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	53	Itaju, SP	Centro	2020	Pera	
4 (C1)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	85	Pongáí, SP	Centro	2020	Valência	
1 (A2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	22	Itajobi, SP	Nordeste	2020	Valência	
3 (1)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	133	Olímpia, SP	Norte	2020	Hamlin	
3(A4)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	1	Brotas, SP	Centro	2017	Pera	
4(C5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	3	Brotas, SP	Centro	2017	Pera	
3(B2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	4	Uberaba, MG	Norte	2017	Natal	
3(3)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	7	Uberaba, MG	Norte	2017	Natal	
1(1)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	8	Uberaba, MG	Norte	2017	Natal	
4(A1)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	10	Barretos, SP	Norte	2017	Hamlin	
3(C5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	11	Barretos, SP	Norte	2017	Hamlin	
4(A6)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	13	Barretos, SP	Norte	2017	Hamlin	
1(2)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	15	Barretos, SP	Norte	2017	Hamlin	
1(B2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	17	Guaimbê, SP	Centro	2017	Pera	
4(B5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	18	Guaimbê, SP	Centro	2017	Pera	
2(B4)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	20	Guaimbê, SP	Centro	2017	Pera	
2(B2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	21	Guaimbê, SP	Centro	2017	Pera	
3(C4)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	31	Taquaral, SP	Norte	2017	Hamlin	
4(2)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	36	Taquaral, SP	Norte	2017	Hamlin	
1(A3)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	39	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Hamlin	

1(B4)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	40	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Hamlin
3(5)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	41	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Hamlin
4(A2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	59	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Pera
6(4)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	69	Colômbia, SP	Norte	2017	Hamlin
4(B1)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	70	Colômbia, SP	Norte	2017	Hamlin
1(A1)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	73	Colômbia, SP	Norte	2017	Hamlin
2(B5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	75	Altinópolis, SP	Norte	2017	Hamlin
4(4)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	76	Altinópolis, SP	Norte	2017	Hamlin
5(2)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	77	Altinópolis, SP	Norte	2017	Hamlin
4(1)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	78	Altinópolis, SP	Norte	2017	Hamlin
4(A4)2	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	80	Altinópolis, SP	Norte	2017	Hamlin
5(6)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	83	Bebedouro, SP	Norte	2017	Hamlin
2(5)	Cruz das Almas, BA		2021	Pera	84	Bebedouro, SP	Norte	2017	Hamlin
1(B5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	88	Pirassununga, SP	Sul	2017	Westin
3(B5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	89	Pirassununga, SP	Sul	2017	Westin
4(A4)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	93	Cerqueira Cesar, SP	Sudoeste	2017	Natal
4(B2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	4	São Carlos, SP	Centro	2018	Hamlin, Westin e Rubi
3(A5)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	12	Taquaritinga, SP	Centro	2018	Pera
3(A2)	Bom Jesus da Lapa, BA		2021	Pera	14	Mogi Guaçu, SP	Sul	2018	Hamlin, Westin e Rubi
33	Riolândia, SP	Noroeste	2018	Outras Precoces	16	Ibira, SP	Norte	2018	Pera
923.2	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	21	Guarantã, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
923.10	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	22	Aguaí, SP	Sul	2018	Natal
923.3	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	23	Conchal, SP	Sul	2018	Natal
923.11	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	25	Frutal, MG	Norte	2018	Pera
41	São João da Boa Vista, SP	Sul	2018	Pera	26	Tabapuã, SP	Norte	2018	Hamlin, Westin e Rubi
923.4	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	27	Aguaí, SP	Sul	2018	Natal
923.12	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	29	Ibitinga, SP	Centro	2018	Pera

73	São João da Boa Vista, SP	Sul	2018	Pera	30	Frutal, MG	Norte	2018	Pera
923.5	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	31	Itápolis, SP	Centro	2018	Pera Rio
923.13	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	32	Fernando Prestes, SP	Norte	2018	Natal
88	Artur Nogueira, SP	Sul	2018	Pera	38	Mogi Guaçu, SP	Sul	2018	Natal
117	Casa Branca, SP	Sul	2018	Pera	39	Uru, SP	Centro	2018	Natal
97	Santo Antônio da Posse, SP	Sul	2020	Hamlin	43	Piratininga, SP	Centro	2018	Pera
923.6	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	45	Colina, SP	Norte	2018	Valência e Folha Murcha
923.14	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	46	Aguaí, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha
95	Mococa, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha	50	Itápolis, SP	Centro	2018	Natal
119	Casa Branca, SP	Sul	2018	Pera	102	São Pedro, SP	Centro	2018	Hamlin, Westin e Rubi
196	Casa Branca, SP	Sul	2020	Pera	104	Mococa, SP	Sul	2018	Natal
923.7	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	107	Engenheiro Coelho, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha
199	Artur Nogueira, SP	Sul	2021	Valência	108	São Pedro, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
923.8	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2020	Pera	110	Mococa, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha
185	Cabrália Paulista, SP	Centro	2018	Pera	111	Brotas, SP	Centro	2018	Pera
923.1	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2018	Pera	112	Itápolis, SP	Centro	2018	Hamlin, Westin e Rubi
923.9	Santa Barbara D'Oeste, SP	Centro	2018	Pera	113	Piratininga, SP	Centro	2018	Pera
48	Aguaí, SP	Sul	2017	Folha Murcha	5	Ubirajara, SP	Centro	2018	Pera
5(5)	Cruz das Almas, BA		2020	Pera	8	Ribeirão Bonito, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
52	Aguaí, SP	Sul	2017	Folha Murcha	28	Rincão, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
5(1)	Cruz das Almas, BA		2020	Pera	34	Tambaú, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha
56	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Pera	36	Uru, SP	Centro	2018	Natal
69	Tatuí, SP	Sudoeste	2018	Natal	51	Itápolis, SP	Centro	2018	Hamlin, Westin e Rubi

4(5)	Cruz das Almas, BA		2020	Pera	52	Gavião Peixoto, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
58	Mogi Mirim, SP	Sul	2017	Pera	53	Gavião Peixoto, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
74	Conchal, SP	Sul	2018	Hamlin, Westin e Rubi	54	São João da Boa Vista, SP	Sul	2018	Valência e Folha Murcha
63	Tambaú, SP	Sul	2017	Pera	55	Itápolis, SP	Centro	2018	Valência e Folha Murcha
94	Pirassununga, SP	Sul	2018	Valência e folha murcha	58	Cedral, SP	Norte	2018	Hamlin, Westin e Rubi
37	Itápolis, SP	Centro	2018	Pera	60	Bebedouro, SP	Norte	2018	Valência e Folha Murcha
13	Santa Rosa de Viterbo, SP	Norte	2018	Valência e folha murcha	70	Pedregulho, SP	Norte	2018	Hamlin, Westin e Rubi
24	Limeira, SP	Sul	2019	Pera	76	Pedranópolis, SP	Noroeste	2018	Natal
					94	Itápolis, SP	Centro	2019	Pera
					73	Conchal, SP	Sul	2019	Pera
					30	Santa Salete, SP	Noroeste	2019	Pera
					10	Mirassol, SP	Noroeste	2019	Pera
					88	Taquaral, SP	Norte	2019	Hamlin
					99	Uru, SP	Centro	2019	Pera
					129	Conchal, SP	Sul	2019	Pera
					115	Limeira, SP	Sul	2019	Seleta
					178	Pirajuí, SP	Centro	2019	Pera
					90	Taquaral, SP	Norte	2019	Hamlin
					186	São Carlos, SP	Centro	2019	Valência Americana
					29	Santa Salete, SP	Noroeste	2019	Pera
					52	Ribeirão Bonito, SP	Centro	2019	Natal
					34	Tabatinga, SP	Centro	2019	Valência Americana
					124	Limeira, SP	Sul	2019	Valência
					51	Ribeirão Bonito, SP	Centro	2019	Valência
					78	Tabatinga, SP	Centro	2019	Pera
					59	Conchal, SP	Sul	2019	Folha Murcha
					6	Botucatu, SP	Sudoeste	2020	Natal
					7	Botucatu, SP	Sudoeste	2020	Natal
					11	Ribeirão Bonito, SP	Centro	2020	Valência
					14	Cosmorama, SP	Noroeste	2020	Valência América

16	Santo Antônio da Alegria, SP	Norte	2020	Pera
22	Itajobi, SP	Nordeste	2020	Valência
26	Trabiju, SP	Centro	2020	Pera
34	Mococa, SP	Sul	2020	Hamlin
41	Itaí, SP	Sudoeste	2020	Hamlin
5	Botucatu, SP	Sudoeste	2020	Natal
53	Itaju, SP	Centro	2020	Pera
55	Avaí, SP	Centro	2020	Hamlin
58	Botucatu, SP	Sudoeste	2020	Hamlin
79	Paraíso, SP	Norte	2020	Pera
85	Pongaí, SP	Centro	2020	Valência
91	Iacanga, SP	Centro	2020	Pera
93	Nipoã, SP	Noroeste	2020	Pera
102	Itápolis, SP	Centro	2020	Valência
103	Itápolis, SP	Centro	2020	Valência
111	Colômbia, SP	Norte	2020	Natal
117	Pedranópolis, SP	Noroeste	2020	Valência Americana
118	Pedranópolis, SP	Noroeste	2020	Valência Americana
129	Brotas, SP	Centro	2020	Valência
159	Frutal, MG	Norte	2020	Valência
82	Leme, SP	Sul	2020	Valência
170	Matão, SP	Centro	2020	Valência Americana
138	Campina, SP	Sudoeste	2020	Hamlin
25	Trabiju, SP	Centro	2020	Pera
147	Cajobi, SP	Norte	2020	Natal
153	Tanabi, SP	Noroeste	2020	Folha Murcha
141	Cafelândia, SP	Centro	2020	Valência
166	Matão, SP	Centro	2020	Valência
160	Frutal, MG	Norte	2020	Valência
154	Tanabi, SP	Noroeste	2020	Folha Murcha
135	Iacanga, SP	Centro	2020	Valência Americana

Tabela Suplementar 2 Amostras de limbo foliar de *Citrus x sinensis* L. (Osbeck) utilizadas para a quantificação de vírus das estirpes CRD e SJP de CiLV-C.

Folhas			
CRD		SJP	
Número da amostra	Procedência	Número da amostra	Procedência
34	Cordeirópolis	2	São José do Rio Preto
36	Cordeirópolis	3	São José do Rio Preto
37	Cordeirópolis	4	São José do Rio Preto
38	Cordeirópolis	5	São José do Rio Preto
39	Cordeirópolis	7	São José do Rio Preto
40	Cordeirópolis	8	São José do Rio Preto
41	Cordeirópolis	9	São José do Rio Preto
42	Cordeirópolis	10	São José do Rio Preto
43	Cordeirópolis	11	São José do Rio Preto
44	Cordeirópolis	12	São José do Rio Preto
45	Cordeirópolis	13	São José do Rio Preto
46	Cordeirópolis	14	São José do Rio Preto
47	Cordeirópolis	15	São José do Rio Preto
48	Cordeirópolis	16	São José do Rio Preto
50	Cordeirópolis	17	São José do Rio Preto
51	Cordeirópolis	18	São José do Rio Preto
53	Piracicaba	19	São José do Rio Preto
54	Piracicaba	20	São José do Rio Preto
55	Piracicaba	21	São José do Rio Preto
60	Piracicaba	22	São José do Rio Preto
64	Piracicaba	23	São José do Rio Preto
65	Piracicaba	24	São José do Rio Preto
67	Piracicaba	25	São José do Rio Preto
68	Piracicaba	26	São José do Rio Preto
69	Piracicaba	27	Piracicaba
70	Piracicaba	28	Piracicaba
73	Piracicaba	29	Piracicaba
75	Piracicaba	30	Piracicaba
77	Piracicaba	31	Piracicaba
80	Piracicaba	32	Piracicaba
83	Piracicaba	33	Piracicaba
85	Piracicaba	149	Cordeirópolis
91	Piracicaba	150	Cordeirópolis
94	Piracicaba	151	Cordeirópolis
95	Piracicaba	152	Cordeirópolis
97	Piracicaba	154	Cordeirópolis
82	Cordeirópolis	155	Cordeirópolis

84	Cordeirópolis	156	Cordeirópolis
87	Cordeirópolis	157	Cordeirópolis
102	Cordeirópolis	159	Cordeirópolis
104	Cordeirópolis	160	Cordeirópolis
105	Cordeirópolis	161	Cordeirópolis
106	Cordeirópolis	162	Cordeirópolis
108	Cordeirópolis	163	Cordeirópolis
109	Cordeirópolis	164	Cordeirópolis
110	Cordeirópolis	208	Jaboticabal
111	Cordeirópolis	210	Jaboticabal
112	Cordeirópolis	214	Jaboticabal
113	Cordeirópolis	221	Jaboticabal
114	Cordeirópolis	227	Jaboticabal
115	Cordeirópolis	228	Jaboticabal
116	Cordeirópolis	230	Jaboticabal
117	Cordeirópolis	232	Jaboticabal
118	Cordeirópolis	234	Jaboticabal
119	Cordeirópolis	235	Jaboticabal
120	Cordeirópolis	236	Jaboticabal
121	Cordeirópolis	237	Jaboticabal
122	Cordeirópolis	239	Jaboticabal
126	Cordeirópolis	243	Jaboticabal
127	Cordeirópolis	244	Jaboticabal
128	Cordeirópolis	246	Jaboticabal
129	Cordeirópolis	248	Jaboticabal
130	Cordeirópolis	250	Jaboticabal
131	Cordeirópolis	251	Jaboticabal
133	Cordeirópolis	254	Jaboticabal
134	Cordeirópolis	255	Jaboticabal
137	Cordeirópolis		
138	Cordeirópolis		
139	Cordeirópolis		
140	Cordeirópolis		
141	Cordeirópolis		
145	Cordeirópolis		
147	Cordeirópolis		
148	Cordeirópolis		

Tabela Suplementar 3 Análises estatísticas Shapiro Wilk, Teste T, Teste Mann-Whitney, Teste Kruskal-Wallis dos grupos amostrais utilizados durante o trabalho.

	Tratamento	n=	Shapiro Wilk	Teste T	Mann-Whitney	Kruskal-Wallis
Grupos amostrais			p-value	p-value	p-value	p-value
2020	CRD	17	0,00	ND	0,21	ND
	SJP	43	0,00			
2018	CRD	15	0,00	ND	0,00	ND
	SJP	41	0,00			
2017	CRD	4	0,14	ND	0,16	ND
	SJP	32	0,00			
Pera	CRD	70	0,00	ND	0,14	ND
	SJP	32	0,00			
Valência Folha Murcha	CRD	3	0,62	0,02	ND	ND
	SJP	14	0,06			
Centro	CRD	16	0,01	ND	0,00	ND
	SJP	51	0,00			
Sul	CRD	16	0,03	ND	0,00	ND
	SJP	23	0,02			
Pêra Áreas	Bahia	45	0,00	ND	0,04	ND
	SP-MG	25	0,00			
Variedades*	ND	116	ND	ND	ND	0,46
Setores Citrícolas**	ND	130	ND	ND	ND	0,43
Total frutos	CRD	80	0,00	ND	0,00	ND
	SJP	134	0,00			
Total folhas	CRD	74	0,00	ND	0,04	ND
	SJP	66	0,00			

*: Valência, Valência Folha Murcha, Valência Americana, Pêra, Natal, Hamlin, Folha Murcha. **: Centro, Sul, Norte, Noroeste, Sudoeste. ND: Não definido.