

FRANK MAGNO DA COSTA

**ESTUDOS SOBRE A TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS
CITROS E DA MANCHA ANULAR DO CAFEIEIRO PELO ÁCARO
Brevipalpus phoenicis (GEIJSKES) (ACARI: TENUIPALPIDAE)**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

FRANK MAGNO DA COSTA

**ESTUDOS SOBRE A TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS
CITROS E DA MANCHA ANULAR DO CAFEIEIRO PELO ÁCARO
Brevipalpus phoenicis (GEIJSKES) (ACARI: TENUIPALPIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

Ficha catalográfica

C837e Costa, Frank Magno da
Estudos sobre a transmissão do vírus da leprose dos
citros e da mancha anular do cafeeiro pelo ácaro *Brevipalpus
phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) / Frank Magno da
Costa. -- 2011.
90 f.: il.

Orientador: Manoel Guedes Corrêa Gondim Júnior.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,
Recife, 2011.

Referências.

1. Viroses de plantas 2. Interação vírus-vetor 3. Coffee
ringspot vírus 4. *Citrus leprosis vírus* 5. PCR quantitativo
I. Gondim Júnior, Manoel Guedes Corrêa, orientador
II. Título

CDD 632.8

**ESTUDOS SOBRE A TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS E DA
MANCHA ANULAR DO CAFEIRO PELO ÁCARO *Brevipalpus phoenicis*
(GELJSKES) (ACARI: TENUIPALPIDAE)**

FRANK MAGNO DA COSTA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Manoel Guedes Corrêa Gondim Júnior (UFRPE) – Orientador

Dra. Juliana Freitas-Astúa (EMBRAPA / IAC / CAPTACSM) – Co-orientador

Dra. Denise Navia Magalhães (EMBRAPA / CENARGEN) – Co-orientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

**ESTUDOS SOBRE A TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS E DA
MANCHA ANULAR DO CAFEIEIRO PELO ÁCARO *Brevipalpus phoenicis*
(GELJSKES) (ACARI: TENUIPALPIDAE)**

FRANK MAGNO DA COSTA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2011

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Manoel Guedes Corrêa Gondim Júnior (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dra. Juliana Freitas-Astúa (EMBRAPA/IAC/CAPTACSM)

Dra. Marinês Bastianel (IAC/CAPTACSM)

Dra. Denise Navia Magalhães (EMBRAPA/CENARGEN)

Prof. Dr. Gilvan Pio Ribeiro (UFRPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

*...À minha mãe **Helena Pereira da Costa**,
por me ensinar o significado do AMOR
INCONDICIONAL, além da educação,
incentivo e confiança a mim dedicado.*

DEDICO

*...A **Francisco Martins Neto e Antônia
Maria de Oliveira Martins**, por provarem
que a relação pais e filho pode ser
assintótica, mesmo quando meros laços
sanguíneos não são reais.*

OFEREÇO

“Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-O em todos os teus caminhos, e Ele endireitará as tuas veredas. Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que as pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela.”

Provérbios de Salomão 3:5-6 e 13-15

Bíblia Sagrada

(Almeida Revista e Atualizada)

AGRADECIMENTOS

“Nenhum homem é uma ilha isolada; sozinho em si mesmo; cada homem é uma partícula do continente, uma parte da terra”.

John Donne

Por isso, é imprescindível agradecer à:

Aquele que é o alfa e o ômega, o princípio e o fim, todo poderoso e senhor DEUS. Por seu infinito, ímpar, incomensurável e transcendental amor. Grato sou a Ti, ó Senhor, pois sem Ti nada sou e nada posso fazer.

Helena Pereira da Costa, por amor verdadeiro, pelas orações em meu favor, pelo apoio incessante, por estar diretamente relacionada na formação do meu caráter e por me ensinar que sem luta não há vitória.

Francisco Martins Neto e Antônia Maria de Oliveira Martins por permitir que os inexplicáveis fatores do coração sobrepujassem as convenções biológicas, me acolhendo em seu seio familiar e me chamando de filho e ainda pela incansável luta do dia-a-dia, na preocupação de sempre me oferecer o melhor.

Coordenação de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudo, sem a qual nada teria se tornado real.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, por me receber no seu programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e por me conferir o título de Doutor em Fitopatologia.

Professor Dr. Manoel Guedes Corrêa Gondim Júnior, por viabilizar a execução deste trabalho, sempre buscando prover o necessário para a realização do mesmo.

Dra. Juliana Freitas-Astúa pela orientação na condução deste trabalho, sem a qual nada teria sido possível.

Dra. Marinês Bastianel pelo apoio, incentivo, co-orientação e participação na redação dos trabalhos.

Dr. Marcos Antônio Machado, por me receber no Instituto Agronômico para realização dos experimentos.

Fabírcia Silva (minha noiva), por compreender minha ausência na reta final do curso, demonstrando carinho, atenção, preocupação e incentivo para a conclusão do Doutorado.

Karen Kubo e Rodrigo Stuart, pelo incentivo constante, bom humor sempre presente, cumplicidade e orientações na realização dos trabalhos e pela parceria nas horas de diversão, dando força nas horas de luta, apoio nas derrotas e alegrias nas vitórias e ainda pelos trabalhos

realizados juntos, “amigos para sempre é o que nós iremos ser, na primavera ou em qualquer das estações”.

Valéria Mafra, pela disponibilidade de sempre atender-me quando solicitada nos esclarecimentos das dúvidas e orientações nas execuções das análises laboratoriais.

Juliana Pereira, pelo treinamento inicial no laboratório e pelos momentos de descontrações. Amizade verdadeira “não tem preço”.

Maria Andréia Nunes, pelo auxílio na condução e avaliação de alguns experimentos.

Dra. Valdenice Novelli, Gabriela Arena, Hemilly Mutti, Renata Antonioli-Luizon, Polyana Martins, Eliane Locali-Fabris, Derik Guidotti e Vandeclei Rodrigues, pela convivência em grupo.

Todos os amigos do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’, pela amizade.

A todos o meu,

Muito Obrigado

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
CAPÍTULO I - Introdução geral	2
O setor citrícola no Brasil	2
O café no Brasil	5
Classificação, caracterização e biologia do ácaro <i>Brevipalpus phoenicis</i>	7
Vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i> – VTB	9
Caracterização das relações vírus-vetor	12
PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	17
Referências bibliográficas	18
CAPÍTULO II - Detecção e quantificação do <i>Citrus leprosis virus C</i> em <i>Brevipalpus phoenicis</i> (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) por qPCR	31
Resumo	32
Abstract	34
Introdução	35
Material e métodos	36
Resultados	41
Discussão	42
Agradecimentos	44
Referências bibliográficas	44
CAPÍTULO III - Interação do vírus da mancha anular do cafeeiro com <i>Brevipalpus phoenicis</i> (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)	55
Resumo	56
Abstract	57
Introdução	58
Material e métodos	59
Resultados	64
Discussão	66
Agradecimentos	69
Referências bibliográficas	69
Considerações finais	80

RESUMO

Ácaros *Brevipalpus* são vetores de inúmeros vírus, comumente chamados de vírus transmitidos por *Brevipalpus*- VTB. Dentre esses, o vírus da leprose dos citros (*Citrus leprosis virus C*, CiLV-C) e o vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV) são importantes devido aos danos que causam em *Citrus* spp. e *Coffea* spp., respectivamente. Os sintomas ocorrem de maneira localizada em folhas e frutos. As interações entre os vírus e seus vetores apresentam particular interesse, tanto do ponto de vista científico quanto no desenvolvimento de novas abordagens para o controle das doenças por eles causadas. Entretanto, para esses e outros VTB, as interações são ainda pouco conhecidas. Estudos preliminares sugerem que o CoRSV se replica no interior do ácaro vetor, enquanto o CiLV-C apenas circula. O objetivo deste trabalho foi investigar os tipos de interações estabelecidas entre o CiLV-C e o CoRSV com *B. phoenicis*. Fêmeas adultas de *B. phoenicis* avirulíferas foram submetidas a um período de acesso para aquisição dos respectivos vírus durante cinco dias. Após esse tempo foram transferidas para hospedeiros (tratamentos): feijão-de-porco (não hospedeira dos vírus), plantas suscetíveis, sintomáticas e/ou sadias (laranja doce e cafeeiro) e coletadas após quatro diferentes períodos de tempo: 0; 7; 14 e 21 dias. As interações foram investigadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e testes de transmissão. A qPCR revelou que não houve aumento da carga viral ao longo do tempo em nenhum dos tratamentos avaliados para nenhum dos vírus em questão. A MET não detectou partículas de CiLV-C e CoRSV. A taxa de transmissão do CiLV-C foi de 83; 75 e 58% para os tratamentos frutos de laranja sintomáticos, feijão-de-porco e frutos de laranja sadio, respectivamente. Os primeiros sintomas de leprose dos citros foram observados após 30±5 dias após a infestação dos ácaros. Nos testes de transmissão de CoRSV nenhum sintoma da mancha anular foi observado durante um período de seis meses. Estes resultados indicam a necessidade de longo período é necessário antes da transmissão do CoRSV pelo vetor. Para o CiLV-C os resultados indicam que o tipo de interação vírus-vetor é persistente circulativa.

Palavras-chave: Interação vírus-vetor, CoRSV, CiLV-C, qPCR, transmissão.

ABSTRACT

Brevipalpus mites are vectors of several plant viruses called *Brevipalpus* transmitted virus –BrTV. Among these, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) and Coffee ringspot virus (CoRSV) are important due to the damages caused in *Citrus* spp. and *Coffea* spp., respectively. The symptoms occur as localized infection on both leaves and fruits. The interactions between vector and virus are of particular interest both from the scientific perspective and on the development of control measures. However, for these and other BrTV, the mode interactions are still unknown. Preliminary study suggests that CoRSV replicates in the vector tissue, while CiLV-C is mode circulates manner. The aim of this study was to investigate the interactions established between CiLV-C and CoRSV with *B. phoenicis*. Adult females aviruliferous of *B. phoenicis* were submitted to acquisition access period of respective virus during five days. After this time they were transferred to hosts (treatments): mungbean (*Canavalia ensiformis*, non-host of the virus), symptomatic and healthy (citrus and coffee plants) and collected after four different periods of time: 0; 7; 14 and 21 days. The interactions were investigated by real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), transmission electron microscopy (TEM) and transmission assays. The qPCR revealed that there was no increase in viral load over time in all treatments for any of the virus in question. The TEM, it was not possible to detect particles of CiLV-C or CoRSV. CiLV-C transmission rate was 83, 75% and 58% for the treatments symptomatic citrus, mungbean and healthy citrus, respectively. The first symptoms of the leprosis were observed after 30±5 days after mites infestation. In the CoRSV transmission assays no symptoms of coffee ringspot were observed during a period of six months. These results suggest that a long incubation period was be necessary before CoRSV transmission by the vector. By the CiLV-C the results indicate that interaction type virus-vector is of the circulative mode.

Keywords: virus-vector interactions, CoRSV, CiLV-C, qPCR, transmission.

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

O setor citrícola no Brasil

Originária do sul do continente asiático, provavelmente da China, a cultura dos citros foi levada por árabes para a Europa. Por volta dos anos 1500 d.C., as expedições de Cristovão Colombo traziam consigo mudas cítricas, introduzindo-as então no continente Americano. A introdução de tal cultura no Brasil remonta do início da colonização do país pelos portugueses, em meados do século XVI e destacou-se pelo fato de as condições edafoclimáticas predominantes no país serem favoráveis tanto à fase vegetativa, quanto à fase produtiva, quando comparada com aquelas condições existentes no centro de origem (NEVES et al., 2010).

Desde sua introdução, os citros são cultivados em âmbito nacional, contudo seu potencial produtivo permaneceu pouco explorado por um longo período. A partir da segunda década do século passado, quando foi criado o primeiro núcleo citrícola nacional, no Estado do Rio de Janeiro, a citricultura ganhou destaque. A produção de tal núcleo atendia as cidades do Rio de Janeiro e São Paulo e começou a abastecer também o mercado externo, quando da exportação de produtos para a Argentina, Inglaterra e alguns outros países europeus (BOTEON; NEVES, 2005).

A citricultura brasileira tem apresentado números impressionantes nos últimos anos, isso porque em 2009 o complexo citrícola brasileiro foi responsável por cerca de 2,15 milhões de toneladas de produtos, que gerou uma receita de aproximadamente US\$ 1,84 bilhão. Atualmente, o Brasil detém mais da metade da produção mundial de suco de laranja concentrado e congelado, e cerca de 98% dessa produção é destinada ao mercado externo (NEVES et al., 2010).

Os plantios comerciais de frutas cítricas como variedades copas (enxertos), encontram-se distribuídos em seis grupos: laranjas [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], tangerinas (*C. reticulata* Blanco e *C. deliciosa* Ten.), limões [*C. limon* (L.) Burm.], limas ácidas (*C. latifolia* Tanaka), pomelos (*C. maxima* L.) e outros de menor importância. Dentre os citros mais cultivados destaca-se o grupo das laranjas doces, seguida pelas tangerinas, limões e limas ácidas. No Brasil, as variedades comerciais mais importantes de laranjas doce são: Pêra, Natal, Valência e Hamlin (MATTOS JÚNIOR et al., 2005; PIO et al., 2005).

Nos últimos seis anos houve um crescimento da área plantada com citros de cerca de 17%, o que corresponde a aproximadamente 7,63 milhões de ha no mundo. A área ocupada com a produção de frutas cítricas é a segunda maior em relação às demais frutas, sendo que a banana ocupa a maior área, cerca de 10,2 milhões de ha. O Brasil ocupa hoje a posição de maior produtor de citros, fato este que se iniciou na safra de 1981/82, quando o país superou a produção dos Estados Unidos da América (EUA) (NEVES et al., 2010).

A produção brasileira de frutas cítricas encontra-se amplamente distribuída em todo o território nacional, sendo que a maior produção está concentrada no Estado de São Paulo. Este Estado é responsável por produzir 14.898.493t de laranja, o que corresponde a 78% da produção nacional. Os Estados da Bahia, Minas Gerais, Sergipe, Paraná, Rio Grande do Sul e Pará também se destacam no cenário nacional como produtores de citros. As demais Unidades da Federação (UF) participam com menos de 1% da produção nacional (IBGE, 2010).

Em se tratando de custos de produção, estudos realizados sobre o uso de agrotóxicos evidenciaram que o controle de pragas e doenças que ocorrem na cultura foi responsável pela movimentação de R\$ 210 milhões no ano de 2009. Das classes dos agrotóxicos, a citricultura se destaca no consumo de acaricidas 6,8 kg/ha. Do total de ingredientes ativos utilizados na citricultura, os acaricidas participaram com 39%, o que representou 1,7% do faturamento do setor de agrotóxicos naquele ano. A perspectiva para a safra 2010/11 é de aumento no consumo de agrotóxicos, em função da melhora na relação de troca e dos preços mais atrativos para a laranja e para o suco de laranja no mercado internacional (NEVES et al., 2010). A ocorrência de pragas e doenças nessa cultura tem ocasionado redução na produtividade da citricultura brasileira. Das doenças que afetam os citros, a leprose merece destaque, pois é responsável por elevados custos de produção, devido à utilização de agrotóxicos para o controle do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Tenuipalpidae) (BASTIANEL et al., 2010). A leprose figura como uma das mais importantes doenças para a citricultura brasileira, cujo agente causal é o *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), transmitido pelo ácaro *B. phoenicis* (BITTANCOURT, 1956; MAIA; OLIVEIRA, 2005, NUNES, 2007; RODRIGUES et al., 2003).

A manifestação dos sintomas se dá através de lesões locais tanto em frutos quanto em folhas e ramos. O primeiro relato e/ou descrição de tal doença na cultura dos citros foi feito por Fawcett no distrito de Pinellas, Flórida, nos EUA e datam de 1901. Essa doença ficou inicialmente conhecida como “scaly bark” (FAWCETT, 1909).

No continente Sul-Americano as primeiras observações da leprose dos citros foram realizadas na segunda década do século passado no Paraguai, cuja denominação era “lepra

explosiva” (SPEGAZZINI, 1920). Os primeiros sintomas desta doença no Brasil foram observados na região de Sorocaba, Estado de São Paulo, na década de 30 do século passado, quando Bittancourt fez a constatação. Segundo o autor, a relevância da doença deve-se ao fato de as condições edafo-climáticas favorecerem tanto o desenvolvimento da cultura, quanto do próprio vetor, o que propicia o desencadeamento do processo doença, refletindo assim em perdas em produção e produtividade (BITTANCOURT, 1934). Desde então, a leprose vem sendo relatada como um problema fitossanitário para a citricultura brasileira.

Sua presença já foi confirmada em quase todos os Estados brasileiros que compõem as cinco macro-regiões do país, a saber: Região Norte: Acre (FREITAS-ASTÚA et al., 2004a), Amazonas e Pará (BOARI et al., 2007a), Roraima e Tocantins (DOMINGUES; RODRIGUES, 1999). Região Nordeste: Bahia, Ceará, Piauí e Sergipe (BOARI et al., 2007a). Região Centro-Oeste: Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (NOVELLI et al., 2006). Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (BRIOSO et al., 1998), São Paulo (BITTANCOURT, 1934). Região Sul: Paraná e Rio Grande do Sul (BASSANEZI; YAMAMOTO, 2004; FREITAS-ASTÚA et al., 2004b.), Santa Catarina (BASTIANEL et al., 2010). Em apenas sete UFs não existem relatos oficiais de ocorrência dessa doença, são eles: Alagoas, Amapá, Maranhão, Paraíba Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rondônia (BASTIANEL et al., 2010).

A leprose é principalmente uma doença das laranjas doce. Nas folhas, o vírus induz a presença de manchas arredondadas frequentemente salientes na página inferior e lisas na face superior. A coloração varia de verde pálida a marrom no centro, com um halo amarelado ao redor. Quando em elevada incidência, pode provocar queda prematura das folhas, reduzindo assim a capacidade fotossintética da planta, e promovendo redução na produção. Em frutos, as lesões são distribuídas de forma irregular na superfície. Quando o fruto ainda está verde, ocorre a presença de um halo amarelo circundando a lesão. Uma vez maduro, a mancha no fruto torna-se escura com uma depressão da casca. Quando as lesões são abundantes, há queda de folhas e frutos. Em ramos novos, as lesões são amareladas, porém com o passar do tempo passam a assumir coloração marrom avermelhada. Tornam-se escamadas e adquirem uma casca grossa, algumas vezes confundida com lesões de cancro cítrico ou lembrando o descamamento induzido pela sorose. A ocorrência de grande número de lesões pode ocasionar morte de ponteiros. As lesões da casca podem coalescer em galhos mais grossos, induzindo a morte descendente dos ramos, causando declínio e morte da planta (BASSANEZI; YAMAMOTO, 2004; BASTIANEL et al., 2006; BITTANCOURT, 1955; FEICHTENBERGER et al., 2005; RODRIGUES et al., 2003; ROSSETI, 1995).

Estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a presença de partículas de CiLV-C em folhas com sintomas típicos da leprose, o que não foi observado quando se fez seções ultrafinas de folhas sadias ou assintomáticas (COLARICCIO et al., 1995; KITAJIMA et al., 1972, 2004). Esse fato é corroborado com a técnica da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa [reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)], sendo que a banda correspondente à região do ácido nucléico do vírus só aparece a partir de material extraído de áreas de lesões características da doença (FREITAS-ASTÚA, *comunicação pessoal*). A disseminação da doença para as demais plantas está diretamente relacionada com a dispersão do ácaro vetor dentro do pomar e também ao processo de alimentação deste (RODRIGUES et al., 2003).

O café no Brasil

O café é considerado uma bebida típica do Brasil, apesar de ser consumido por um terço da população mundial. Antes do século XVII, nenhuma muda de café havia sido plantada fora da África ou Arábia. Existem fortes evidências de que o café teria entrado na região norte do Brasil em 1727, onde foi cultivado inicialmente, oriundo da Guiana Francesa. O grande incremento da cultura no País ocorreu a partir do momento em que passou a ser explorada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. Já no final do século XVIII, o Brasil obteve a supremacia na produção mundial, e esta “hegemonia” é mantida até hoje (MANZATO et al., 2003; MATIELLO et al., 2002; PINO et al., 1999; THOMAZIELLO et al., 2000).

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Podem-se considerar duas espécies que são exploradas comercialmente: *C. arabica* L. e *C. canephora* Pierre. O café arábica, predominante no Brasil, é uma planta tropical originária dos altiplanos da Etiópia, onde vegeta espontaneamente a uma altitude de 1.500 a 1.900 metros, com temperatura média anual oscilando entre 17°C e 20°C e chuvas anuais entre 1.500 a 2.000mm (CARVAJAL, 1972). Segundo Coste (1968), o cafeeiro geralmente prospera nas regiões onde ocorrem períodos relativamente secos na fase de reposição vegetativa (dormência), que precede a floração.

Amplamente cultivada no país, a cultura do café tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, seguido pelos estados do Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia Paraná, Rio de Janeiro, Pará e Mato Grosso (ABIC, 2010).

A expansão do cultivo do café no Brasil fez surgir alguns problemas de ordem fitossanitária. Dentre as doenças que afetam o cafeeiro, cita-se a mancha anular. Esta doença foi relatada pela primeira vez no Estado de São Paulo por Bittancourt (1938, 1939) e o mesmo fez menção de que, no futuro, tal doença poderia vir a ser um fator desfavorável à cafeicultura brasileira.

A mancha anular do cafeeiro tem como agente etiológico o Coffee ringspot virus (CoRSV). Desde sua primeira detecção e por quase meio século esta doença foi considerada de importância secundária, pois não causava grandes problemas econômicos. A partir do ano de 1986 passou a ganhar notoriedade, quando se observou um aumento substancial na presença de sintomas em plantas de café arábica no Estado de Minas Gerais. Tais sintomas estavam associados à desfolha intensa, devido às condições climáticas propícias à multiplicação do ácaro vetor no campo (CHAGAS, 1988). Um ano após a doença ter sido constatada no Estado de Minas Gerais, sintomas diferentes daqueles mencionados na literatura foram observados no Estado do Espírito Santo, como pequenas lesões que passavam de amarela a necrótica ao longo da nervura principal (MATIELLO, 1987).

Assim como na leprose dos citros, o vírus da mancha anular do cafeeiro é transmitido pelo ácaro plano *B. phoenicis*, que é considerado uma espécie polífaga, ocorrendo em mais de 486 espécies de plantas. Este ácaro é de ocorrência natural em cafeeiros, porém não são encontrados na literatura relatos de danos primários causados à cultura pela ação da alimentação do mesmo, sendo sua importância restrita à capacidade de atuar como vetor do vírus (THOMAZIELLO et al., 2000).

No ano de 1995 foi registrado um surto de mancha anular no sul de Minas Gerais e Triângulo Mineiro (principais regiões produtoras de café do Estado), com cerca de 80 a 100% de infecção das plantas cultivadas naquele. Conseqüentemente as perdas foram em torno de 20% da produção. O aumento na área destinada ao cultivo do café, associado a distúrbios ecológicos além dos efeitos dos agrotóxicos nos inimigos naturais do ácaro pode ter favorecido o vetor. Outra hipótese levantada na época seria uma possível mutação no vírus. De acordo com Figueira et al., (1995) e Juliatti et al., (1995), estas seriam as prováveis causas atribuídas à severidade daquele surto.

Os sintomas da doença ocorrem tanto nas folhas como em frutos e, menos frequentemente, em galhos ou ramos. Nas folhas, as lesões iniciam como manchas pequenas, cloróticas e circunscritas em forma de anel. Algumas vezes são irregulares, porém aumentam de tamanho com a evolução da doença e podem coalescer e atingir toda a área foliar, expandindo-se em alguns casos ao longo das nervuras, tanto a principal quanto as secundárias.

Outras vezes é possível observar um pequeno ponto necrótico bem no centro da lesão. À medida que a folha entra em senescência, nota-se que a área lesionada fica como um ponto e/ou ilhas verdes, enquanto a folha torna-se amarelada (CHAGAS et al., 1978, 2003).

Os sintomas são difíceis de serem reconhecidos em frutos verdes, pois se apresentam como manchas verde-claras. Nas variedades de café cujos frutos possuem coloração vermelha quando maduros, branqueamento, manchas verde-claras ou anéis de diferentes diâmetros podem ser vistos na superfície dos mesmos. Anéis freqüentemente deprimidos podem deformar a polpa dos frutos, porém as sementes permanecem aparentemente saudáveis. Em variedades com frutos amarelos, quando maduros, anéis verdes aparecem na superfície, mas tendem a desaparecer nos frutos mais velhos. Plantas severamente afetadas apresentam queda acentuada de folhas e frutos (CHAGAS et al., 1978, 2003).

Grãos de café provenientes de frutos infectados pelo CoRSV apresentam redução de 5% de peso médio, quando comparados com grãos de frutos assintomáticos. Outro efeito da virose no café é que frutos sintomáticos apresentam menor teor de açúcares redutores, menor atividade da polifenoloxidase e maior percentual de compostos fenólicos. Tais características depreciam a qualidade da bebida (BOARI et al., 2006; REIS; CHAGAS, 2001).

Classificação, caracterização e biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis*

O ácaro *B. phoenicis* ou ácaro plano, como é comumente chamado, pertence à classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Acariforme, subordem Prostigmata, superfamília Tetranychoidae e família Tenuipalpidae. Mais de 300 espécies de ácaros do gênero *Brevipalpus* já foram descritas e catalogadas, sendo as espécies consideradas pragas de maior importância para o Brasil são: *B. californicus*, *B. obovatus* e *B. phoenicis*, por estarem envolvidas na transmissão de vírus. A diferenciação entre estas três espécies é realizada pela observação de caracteres morfológicos tais como: padrão cuticular do dorso do ácaro, número de setas dorsais no histerossoma e números de solenídios no tarso II da fêmea (GONZALES, 1975; MORAES; FLECHTMANN, 2008; WELBOURN et al., 2003).

O ácaro vetor do CiLV-C e CoRSV é *B. phoenicis* e as características anatomo-morfológicas que o distingue das duas outras espécies são: *B. californicus* possui seis pares de setas dorso-laterais, enquanto *B. phoenicis* e *B. obovatus* apresentam apenas cinco pares. Em relação a estas duas últimas espécies, *B. phoenicis* possui dois solenídios no tarso II da fêmea, enquanto *B. obovatus* possui apenas um (WELBOURN et al., 2003).

As fêmeas adultas atingem 0,30 x 0,18mm e sua coloração é variável. Diferenças na idade, alimento e condições de temperatura têm grande influência na cor do seu corpo. Quando recém-emergida, a área entre os ocelos (que são vermelhos) é alaranjada e o restante do corpo é amarelo-claro, translúcido com algumas manchas pardas. À medida que a fêmea se alimenta, um nítido padrão verde-escuro a negro, em forma de “H”, aparece no idiossoma (FLECHTMANN et al., 1995). Este padrão desaparece gradativamente e as fêmeas adquirem novamente a coloração alaranjada a carmim pouco antes da morte. Os machos têm o opistossoma afilado posteriormente, sendo uma característica marcante na diferenciação entre machos e fêmeas. Dorsalmente, mostram duas suturas transversais e o tegumento é reticulado (FLECHTMANN et al., 1995).

Cerca de 928 diferentes espécies de plantas, que compõem 513 gêneros com aproximadamente 139 famílias, já foram relatadas como hospedeiras de *Brevipalpus* spp. Deste montante, algo em torno de 486 espécies que compõem 118 gêneros distribuídos em pelo menos 64 famílias são hospedeiras de *B. phoenicis*. Dentre elas destacam-se as famílias Annonaceae, Bombacaceae, Cannaceae, Cyrillaceae, Dennstaedtiaceae, Gentianaceae, Iridaceae, Juglandaceae, Lauraceae, Myricaceae, Nepenthaceae, Passifloraceae, Pedaliaceae, Pinaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sterculiaceae, Strychaceae, Taxodiaceae e Zygophyllaceae, em que muitas delas são cultivadas em extensas áreas no Brasil (CHILDERS et al., 2003a). Diversas plantas daninhas também são hospedeiras de *B. phoenicis*, contudo no Brasil ele é considerado praga de importância econômica apenas em citros, café, chá, diversas frutíferas e plantas ornamentais (MORAES; FLECHTMANN, 2008; OLIVEIRA, 1986; TRINDADE, 1990). Além dos vírus da leprose dos citros e mancha anular do cafeeiro, ácaros *Brevipalpus* têm sido relatados como transmissores de numerosas fitoviroses, todos caracterizados por resultarem em sintomas localizados. Kitajima et al. (2010) relataram cerca de 37 espécies de plantas ornamentais, incluídas em 18 famílias botânicas, como hospedeiras de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB).

O ciclo de vida de *B. phoenicis* é constituído pelas fases de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto, sendo que entre cada estágio ativo existe uma fase quiescente que não se alimenta (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Este ácaro se reproduz principalmente por partenogênese telítoca, isto é, fêmeas não fecundadas dão origem a fêmeas idênticas à progenitora. Pode haver reprodução sexuada, porém os machos são normalmente raros na população, aproximadamente 1% (HELLE et al., 1980). Estudos sobre a biologia de *B. phoenicis* em laranja das variedades Pêra Rio e Valência revelaram que o aumento da temperatura propicia um desenvolvimento mais rápido, assim como o aumento na oviposição.

A maior viabilidade da fase larval (caracterizada como fase crítica) foi observada a 25°C. Nessa temperatura, o período de desenvolvimento de ovo a adulto dura 19,2 dias, enquanto a 20°C a duração foi de 43,5 dias. Na temperatura de 30°C o tempo de desenvolvimento é de apenas 14,4 dias (CHIAVEGATO, 1986a).

Brevipalpus phoenicis ocorre durante todo o ano em culturas como café e citros, porém há determinados períodos em que a sua densidade populacional atinge níveis mais elevados, sendo diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Este ácaro normalmente prolifera com maior intensidade nos meses secos, porém outros fatores também interferem em sua densidade populacional, dentre os quais se destacam: a fenologia das plantas, a cultivar, as condições meteorológicas, a presença de predadores e de possíveis agentes patogênicos (OLIVEIRA, 1986, 1995).

No caso de citros, o ácaro pode ser encontrado em diferentes espécies e híbridos (*C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. limon*, *C. limon* x *C. reticulata*, *C. sinensis* x *C. reticulata*, *C. limettiodes*, *C. limonia*, *C. maxima*, *C. medica*, *C. paradisi*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. spectabilis*, *Citrus* spp.). Tem sido observado experimentalmente que algumas variedades, como laranjas Caipira, Bahia, Baianinha, Valência, Pêra Rio e natal e o tangor Murcott são muito favoráveis ao desenvolvimento de *B. phoenicis* (CHILDERS et al., 2003b; OLIVEIRA, 1995), enquanto outras como a lima da Pérsia, lima ácida e limão Siciliano se comportam como pouco favoráveis (CHIAVEGATO; MISCHAN, 1987).

Em estudos realizados sobre a biologia comparada de *B. phoenicis* em diferentes cultivares de café, observou-se que as cultivares mais favoráveis para a multiplicação de *B. phoenicis* foram Apoatã, Mundo Novo e Obatã, baseando-se nas taxas finitas de crescimento populacional. Neste mesmo estudo foi possível observar ainda que a cultivar Icatu Vermelho mostrou ser a menos favorável à multiplicação de *B. phoenicis* (MENDONÇA, 2006). Deve-se mencionar que a mancha anular do cafeeiro foi constatada em várias outras espécies de *Coffea*, bem como híbridos, mantidos na coleção de germoplasma do Centro APTA Café do Instituto Agrônomo de Campinas (KITAJIMA et al., 2011, no prelo).

Vírus transmitidos por *Brevipalpus* – VTB

Os vírus de plantas são bastante diferentes dos outros fitopatógenos, não apenas no tamanho e forma, mas também na sua constituição química, estrutura física, métodos de infecção, multiplicação, movimento no interior do hospedeiro, disseminação e sintomas que produzem. A disseminação de vírus entre plantas ocorre de diversas maneiras, a saber:

material de propagação vegetativa infectada (mudas, borbulhas, enxertia etc.), transmissão mecânica, sementes infectadas, grãos de pólen, plantas epífitas e/ou parasitas e ainda por vetores como fungos, nematóides, insetos e ácaros (AGRIOS, 2005; HULL, 2002).

Em se tratando de ácaros, as principais famílias cujos membros estão envolvidos no processo de transmissão de vírus de planta são: Eriophyiidae - *Aceria tosichella* vetor de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV); Tetranychidae - *Petrobia latens* vetor de *Barley yellow streak mosaic virus* (BaYSMV) e Tenuipalpidae – *Brevipalpus* sp. vetor de *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), *Coffee ringspot virus* (CoRSV), *Clerodendrum chlorotic spot virus* (ClCSV), *Hibiscus chlorotic spot virus* (HCSV), *Malvaviscus ringspot virus*, *Solanum violaefolium ringspot virus* (SvRSV), *Passion fruit green spot virus* (PFGSV), *Hibiscus green spot virus* (HGSV), *Ligustrum ringspot virus* (LiRSV), *Orchid fleck virus* (OFV), entre outros (FERREIRA et al., 2007; KITAJIMA et al., 2003, 2010; HULL, 2002).

O estabelecimento das relações existentes entre ácaros *Brevipalpus* e o vírus da leprose dos citros foi evidenciado inicialmente na Argentina (FREZZI, 1940). A espécie foi identificada como *Tenuipalpus pseudocuneatus*, considerado sinonímia de *Brevipalpus obovatus*. Dois anos mais tarde, foi comprovado que este mesmo ácaro atuava como vetor do agente causal da “lepra explosiva” do ligustro e da laranja (VERGANI, 1942; VERGANI, 1945). No Brasil, Musmeci; Rossetti (1963) demonstraram que a leprose era transmitida por *B. phoenicis*, tendo sido considerada a principal espécie vetora do vírus onde a leprose ocorria. Chagas (1973) provou que o vírus da mancha anular do cafeeiro é transmitido por *B. phoenicis*. Outros dois vírus, o da pinta verde do maracujazeiro (*Passion fruit greensepot virus* - PFGSV) e o da mancha das orquídeas (*Orchid fleck virus* - OFV), foram considerados como sendo transmitidos por *B. phoenicis* e *B. californicus*, respectivamente (KITAJIMA et al., 1997; MAEDA et al., 1998).

Problemas acarretados por VTB são cada dia maiores e representam uma ameaça para as áreas não afetadas. Até 1990, sabia-se da existência de cinco VTB e hoje esse número aumentou significativamente, para aproximadamente 40, o que mostra a importância crescente do grupo e evidencia o interesse não apenas científico, mas também econômico e epidemiológico do grupo (KITAJIMA et al., 2003, 2010).

Os sintomas produzidos pelos VTB ocorrem de maneira localizada, tanto em folhas quanto em ramos e frutos. As lesões são cloróticas e algumas vezes anelares, podendo ocorrer necrose do tecido vegetal num estágio mais avançado (FRANCKI et al., 1981).

As partículas de vários VTB são baciliformes e morfologicamente semelhantes entre si. Porém, esses vírus são divididos em dois grupos: os citoplasmáticos (VTB-C) e os

nucleares (VTB-N), em função do local de acúmulo em células infectadas e também do efeito citopático que causam nas mesmas. Os VTB-C, apresentam morfologia da partícula do tipo baciliforme e curta, apresentando membrana e medem cerca de 50-60 nm de largura e 110-120 nm de comprimento. Ocorrem isolados ou agrupados no lúmen do retículo endoplasmático (RE), entretanto, os vírions ocasionalmente são vistos na cavidade perinuclear, possivelmente migrando do retículo endoplasmático. Os VTB-N são do tipo não envelopados, medem 40-50nm x 100-110nm, e localizam-se no núcleo (viroplasma e/ou nucleoplasma), comumente associados com membranas tanto do envelope nuclear (EN) quanto do RE. Exemplos de VTB-C são o CiLV-C, PFGSV, LiRSV e SvRSV, enquanto OFV, CICSV e CoRSV são alguns exemplos de VTN-N (KITAJIMA et al., 2003; KONDO et al., 1998, 2003; RODRIGUES et al., 2003).

Em função das semelhanças morfológicas (partículas baciliformes) e de possuírem representantes que acumulam no citoplasma ou no núcleo de células infectadas, os VTB foram originalmente considerados membros tentativos da família *Rhabdoviridae*. Isso porque os rhabdovirus são divididos em seis gêneros, sendo que dois deles (*Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*) possuem representantes que infectam plantas. Entretanto, o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C demonstrou que o vírus não apresenta nenhuma similaridade com rhabdovirus, em se tratando do nível de sequência nucleotídica, organização genômica e/ou possíveis estratégias de replicação. Entretanto os rhabdovirus apresentam genoma monopartido contendo RNA de fita simples e sentido negativo (-ssRNA), enquanto o CiLV-C possui genoma do tipo sentido positivo (+ssRNA) e bipartido, sendo que o RNA1 apresenta 8.745 nucleotídeos (nt) e o RNA2 4.986nt (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Uma vez que o CiLV-C mostrou-se diferente de todos os outros vírus de plantas caracterizados, propôs-se a criação de um novo gênero de fitovírus, *Cilevirus* (de *Citrus leprosis virus C*), sem família atribuída até o momento, tendo o CiLV-C como seu membro-tipo (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2008). Essa proposta foi recentemente aceita pelo comitê internacional de taxonomia de vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV) (CARSTENS, 2010). Apesar de CiLV-C ser o único VTB-C com o genoma completamente sequenciado, outros vírus desse grupo (PFGSV, SvRSV, LiRSV) tiveram regiões de seus genomas sequenciadas e apresentam similaridade com o CiLV-C, sugerindo que possivelmente outros VTB-C sejam também pertencentes ao gênero *Cilevirus* (ANTONIOLI-LUIZON et al., 2009; FERREIRA et al., 2007; LOCALI-FABRIS; FREITAS-ASTÚA; MACHADO, *comunicação pessoal*).

Dentre os VTB-N, o único a ter seu genoma completamente sequenciado foi o Orchid fleck virus (OFV) (KONDO et al., 2006). Esse vírus também foi inicialmente classificado como um membro tentativo da família *Rhabdoviridae* e o sequenciamento, a estrutura e a organização de seu genoma confirmaram essa classificação. No entanto, apesar de haver similaridade especialmente com os nucleorhabdovirus, o fato de seu genoma ser do tipo – ssRNA bipartido (enquanto os nucleorhabdovirus são monopartidos) levou à proposta da criação de um novo gênero dentro da família *Rhabdoviridae*, denominado Dichorhabdovirus (KONDO et al., 2006). Essa classificação, no entanto, não pode ser considerada oficial, uma vez que a proposta da criação desse gênero não foi submetida ao ICTV. De maneira análoga aos VTB-C, sequências parciais de outros VTB-N, como CoRSV e ClCSV, sugerem que eles também devam ser classificados como dichorhabdovirus (LOCALI-FABRIS, KUBO, FREITAS-ASTÚA; KITAJIMA; MACHADO, *comunicação pessoal*).

Caracterização das relações vírus-vetor

Os vírus que infectam vegetais não possuem mecanismos que os tornem capazes de penetrar diretamente no interior da célula pela superfície intacta do hospedeiro. Entretanto, há uma alta especificidade nos mecanismos utilizados por esses patógenos, que os permitem superar esta inabilidade de penetração. Tal especificidade tem implicação direta na sobrevivência e transmissão dos vírus de plantas na natureza. A penetração do vírus na célula da planta se dá de forma passiva, através de ferimentos provocados muitas vezes por fatores ambientais ou por meio de vetores (HULL, 2002; STANGE, 2006).

Vírus não tem no seu genoma informações que permitam sua replicação independente e, portanto, dependem da maquinaria metabólica da célula hospedeira para este mister. Os genomas dos vírus, apesar de simples, são muito variáveis (RNA ou DNA; fita simples ou dupla; senso positivo, negativo ou ambisense; fita única ou fragmentada) (HULL, 2002; TSAI, 2006). Consequentemente, as estratégias de replicação são variadas: no citoplasma ou no núcleo; transcrições diretas ou retrotranscrições, raras incorporações do genoma no hospedeiro etc. O sucesso da replicação dos vírus na célula hospedeira depende de várias circunstâncias: introdução com sucesso no interior da célula, ausência de mecanismos que impeçam sua desencapsidação e degradação do ácido nucléico viral. Mesmo após alguma replicação inicial, os vírus dependem da ausência de mecanismos de silenciamento gênico da hospedeira ou apresentar um bom supressor de silenciamento. Ainda depende da eficiência de informações no genoma do vírus que permitam contornar mecanismos de silenciamento e

outros, e da atuação das proteínas de movimento que permitam o transporte de material replicativo de célula para célula e disseminação a longas distâncias (HULL, 2002).

A maioria dos fitovírus é transmitida da planta infectada para planta sadia por meio de vetores. De cerca dos 22 filos de invertebrados, apenas dois possuem membros que atuam como vetores de vírus que infectam plantas, sendo eles o Arthropoda e o Nematoda. Em se tratando do filo Arthropoda, duas são as classes conhecidas como tendo vetores de fitovírus, a saber: Hexapoda (Insecta) e Arachnida. Apenas na ordem Acari da classe Arachnida são encontrados membros que estão envolvidos com a transmissão natural de fitovírus. Deve-se considerar também o reconhecimento de certos fungos que atuam como vetores de vírus de plantas (HULL, 2002).

As interações entre os vírus e seus vetores apresentam particular interesse, tanto do ponto de vista científico quanto no desenvolvimento de novas abordagens para o controle das doenças por eles causadas. Estes interesses podem ser considerados sob dois pontos de vista. Em primeiro lugar, tais vetores são o principal método de propagação de vírus no campo, podendo causar perdas econômica irreversíveis. Em segundo lugar, há um considerável interesse biológico e molecular nas relações vírus-vetor, especialmente porque tem sido mostrado que alguns vírus conseguem se multiplicar no interior do vetor (HULL, 2002).

Aproximadamente 80% dos vírus de planta dependem de insetos vetores para a transmissão (outros vetores são ácaros, nematóides e fungos), e as interações vírus-planta-vetor são muito específicas. Recentes introduções de begomovírus nas Américas ocorreram a partir da introdução do vetor *Bemisia tabaci* biótipo B no continente. Esta propagação pode ter contribuído para que um vírus pré-existente fosse transmitido a uma série de culturas numa ampla região geográfica (HOHN, 2007; POWER, 2000).

A evolução dos vírus que dependem de um vetor para se mover planta a planta é limitada não só pela adaptação destes à planta hospedeira, mas também pelas exigências de compatibilidade com o vetor. Toda transmissão requer algum tipo de especificidade vírus-vetor, embora o grau de especificidade varie muito entre os patossistemas. Vírus que são transportados no aparelho bucal do vetor são considerados aqueles que têm menores relações específicas com os mesmos e, ainda assim, dependem de uma complexa interação com compostos associados aos vetores (POWER, 2000).

O aumento na gama de hospedeiros dos vetores incrementa a variedade de vírus que são capazes de transmitir, o que implica que a distribuição do vírus é mais limitada pela especificidade das relações vírus-vetor do que pela especificidade vírus-planta. Considerando que muitos vírus têm um leque muito restrito de vetores, quando comparados à

ampla gama de hospedeiros, nenhum vírus teria uma estreita faixa de plantas hospedeiras se eles tivessem muitas espécies de vetores. Porém, a gama de hospedeiros do vetor determina em grande parte a gama de hospedeiros do vírus, sugerindo que o vírus pode se adaptar a novos hospedeiros muito facilmente (GRAY; BANERJEE, 1999; POWER, 2000).

O modo de transmissão de vírus de plantas por inseto e/ou ácaros vetores, tem sido categorizado de acordo com o tipo de associação que este estabelece com o seu transmissor. As primeiras propostas do modo de transmissão foram feitas em 1930 com base na duração da retenção do vírus no vetor. Assim, dois modos de transmissão foram propostos: transmissão não-persistente devido ao curto período de retenção do vírus no vetor e transmissão persistente, pelo longo período de tempo de retenção do vírus no mesmo, que frequentemente ocorre por toda a vida deste (vetor). Com o passar do tempo, diversos vírus mostraram um período de retenção intermediário no vetor, sendo então postulado um novo modo de transmissão, denominado transmissão semi-persistente. Mais adiante uma nova classificação na terminologia foi proposta e amplamente aceita, na qual a transmissão não-persistente passou a ser chamada também de estiletar, enquanto a persistente é hoje referida como circulativa. Anos mais tarde, ela foi subdividida em persistente circulativa não propagativa e persistente circulativa propagativa, ou simplesmente persistente circulativa e persistente propagativa (GRAY; BANERJEE, 1999; HOGENHOUT et al., 2008; HULL, 2002). Em decorrência disso, alguns parâmetros foram atribuídos a cada modo de transmissão, descritos abaixo:

Transmissão não-persistente ou estiletar – o vírus é adquirido e inoculado durante a picada de prova, período que dura de poucos segundos a alguns minutos, sendo rápida a aquisição e inoculação do vírus. O tempo de retenção também é curto (minutos). A picada de prova consiste em uma rápida inserção e retirada do estilete no tecido vegetal com o objetivo de verificar se o hospedeiro é adequado à sua alimentação. Não há requerimento de período de latência no vetor, tampouco transmissão trans-estadial nesse tipo de transmissão, ou seja, não há passagem do vírus no processo de ecdise do vetor. Frequentemente, os vírus envolvidos neste processo são transmitidos por muitas espécies de afídeos como no caso do vírus do mosaico do mamoeiro (*Papaya ringspot virus P*, PRSV-P), transmitido por *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scopoli, *A. coreopsidis* Thomas, *Aphis* sp. e *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (HULL, 2002; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002; GRAY; BANERJEE, 1999; HOGENHOUT et al., 2008; WHITFIELD et al., 2005).

Transmissão Semi-persistente – o vírus necessita de um período maior (algumas horas) de alimentação, para ser adquirido e inoculado pelo vetor, quando comparado com o

modo não-persistente. Estes possuem uma gama restrita de espécies vetoras. Como exemplo cita-se o vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV), cujo vetor é o afídeo *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (HULL, 2002; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002).

Transmissão Persistente circulativa – nesse caso, o vírus necessita de um longo período de aquisição (horas a dias) e apresenta longa retenção (dias a semanas). Os vírus circulativos não propagativos são ingeridos, atravessam o trato digestivo e são liberados na hemocele. Em seguida, se associam às glândulas salivares acessórias e são transportados pelas células e liberados pelo canal salivar. Não há relatos de infecção das células do intestino do vetor por parte do vírus. Esse círculo é restrito e para passar por ele com sucesso, a proteína capsidial do vírus tem que manter uma especificidade antigênica com células vesiculares do vetor. Estes possuem uma restrita gama de vetores e há ocorrência de transmissão transstadial, isto é, passam de uma fase a outra do vetor mesmo após várias ecdises, podendo permanecer o vetor virulífero por toda a sua vida. Estes vírus necessitam de um período de latência que vai de poucas horas a dias para a transmissão. Neste modo de transmissão não há multiplicação do vírus no interior do vetor. Caso típico de transmissão persistente circulativa não propagativa é o do vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* - PLRV), cujo vetor é o pulgão *M. persicae* (HOGENHOUT et al., 2008; HULL, 2002; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002; WHITFIELD et al., 2005).

Transmissão persistente propagativa – vírus circulativos propagativos são aqueles que replicam no vetor. Após a ingestão, o vírus vai infectar células do intestino e subsequentemente outras células, e em seguida, associam-se às glândulas salivares principais e possivelmente às acessórias e depois são liberados pelo canal salivar. O tempo para aquisição é relativamente longo, necessitando também de um período de latência para a sua transmissão, pois as partículas deste tipo de vírus alocam-se na hemolinfa do vetor. Neste tipo de interação, o vírus multiplica-se no vetor e frequentemente ocorre transmissão transovariana, ou seja, a passagem de partículas virais para a progênie. Um exemplo de transmissão persistente propagativa é o vírus do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV) cujo vetor é o tripses *Frankliniella occidentalis* Pergande (HULL, 2002; INOUE-NAGATA; NAGATA, 2002; WHITFIELD et al., 2005).

Para Chiavegato (1995), a aquisição do CiLV-C pelo ácaro ocorre por meio da alimentação em substratos onde há a presença do vírus e todos os estádios ativos de desenvolvimento do ácaro são capazes de transmiti-lo para a planta hospedeira. Segundo Chiavegato e Salibe (1986b) as larvas são capazes de transmitir o CiLV-C após 24 horas da aquisição, mais rapidamente que ninfas e adultos. Uma vez que o ácaro tenha adquirido o

CiLV-C na fase larval, este será capaz de transmiti-lo para a planta por toda a sua vida (OLIVEIRA, 1986).

Knorr (1968) relata transmissão transovariana do CiLV para as progênes de *B. obovatus* e *B. californicus* mas não para *B. phoenicis*. Contudo, estes dados não foram até hoje confirmados. Apenas a transmissão transestadial foi comprovada tanto do CiLV-C, quanto do CoRSV, ou seja, tais vírus não passam da fêmea para a prole via ovo. Portanto, uma vez eclodido o ovo, as larvas precisarão se alimentar diretamente sobre a lesão para tornarem-se virulíferas e somente a partir dessa fase o vírus consegue passar para os estádios de desenvolvimento subsequente (BOARETTO et al., 1994; COSTA et al., 2009; NOVELLI et al., 2005; RODRIGUES et al., 1997). Como consequência de um trabalho de Rodrigues et al. (1997) relatando detecção de partículas do CiLV-C nos tecidos do ácaro *B. phoenicis*, criou-se um consenso de que CiLV-C replicar-se-ia no ácaro. Contudo, estudos subsequentes indicam que a identificação feita por aqueles autores teria sido equivocada (E. W. KITAJIMA, *comunicação pessoal*). As partículas visualizadas por Rodrigues et al. (1997) seriam material paracristalino no interior de grânulos de gema do ovo ainda em formação dentro da fêmea. Partículas identificadas como sendo do CiLV-C, através de ensaios de imunolocalização *in situ*, foram observadas entre membranas de células adjacentes (epitélio do tubo digestivo, glândulas prosomais e outros órgãos no prosoma de vários ácaros procedentes de colônias mantidas em plantas e/ou frutos infectados (CALEGARIO, 2009). Não há informações precisas de como as partículas chegam a estes sítios e como saem pelo canal estiletar para infectar a planta. Não foram detectados viroplasmas nos tecidos do ácaro (KITAJIMA et al., 2008). Ensaio preliminares de qPCR não indicaram aumento do título do CiLV-C nos ácaros que se alimentaram em tecido infectado (NICOLINI-TEIXEIRA, 2008). Todos estes dados em conjunto sugerem fortemente que CiLV-C apenas circula no interior do ácaro, sem se replicar, e assim a relação vírus/vetor seria do tipo persistente-circulativa, não propagativa.

Contudo, há evidências histológicas de que pelo menos para alguns dos VTB há replicação nos tecidos do ácaro. Foi detectada a presença de viroplasma em núcleos de células do epitélio intestinal e de glândulas prosomais, além da presença de partículas no núcleo e citoplasma, reproduzindo o efeito citopático observado nos tecidos das plantas infectadas. Os casos analisados foram em *B. phoenicis* colonizando plantas de *Clerodendrum speciosum* e *Malvaviscus arboreus* infectadas pelo CICSV, cafeeiro infectado pelo CoRSV, citros pelo infectado CiLV-N, e orquídea infectada pelo OFV. Estes dados sugerem fortemente que estes

vírus se replicam no tecido do ácaro vetor, enquanto o CiLV-C apenas circularia (KITAJIMA et al., 2007; KITAJIMA; FREITAS-ASTÚA; *comunicação pessoal*).

PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) difere da PCR clássica pela mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo, permitindo a detecção de um dado ácido nucléico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível, como também a quantificação absoluta inicial do material alvo (BUSTIN, 2000). Basicamente existem dois tipos de quantificação, a absoluta e a relativa. Na quantificação absoluta ocorre a determinação do número exato de moléculas, enquanto na quantificação relativa é realizada uma análise comparativa do ácido nucléico alvo com o do controle interno ou do calibrador. As estratégias capazes de detectar os produtos amplificados por qPCR usam corantes fluorescentes e o processo combina amplificação e detecção dos produtos amplificados pela mensuração da fluorescência (BUSTIN, 2000; GINZINGER, 2002).

Bhohm et al. (1999) foram os primeiros a empregar a técnica de qPCR em plantas, monitorando a presença de patógenos em espécies hospedeiras. Desde então, qPCR vem sendo amplamente utilizada para a quantificação de vírus em seus hospedeiros naturais tais como: *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) (BALAJI et al., 2003), *Plum pox virus* (PPV) em plantas infectadas e no afídeo vetor (OLMOS et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2004; RUIZ-RUIZ et al., 2007; MORENO et al., 2009). *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) (PICÓ et al., 2005), *Solenopsis invicta virus* (SINV) (HASHIMOTO et al., 2007), *Grapevine leafroll associated viruses 1–5 e 9* (GLRaVs) (OSMAN et al., 2007), *Citrus tristeza virus* (CTV), tanto na planta, quanto no vetor (CAMBRA et al., 2006; SAPONARI et al., 2008; BERTOLINI et al., 2008). *Rice stripe virus* (RSV) tanto em plantas quanto no vetor (ZHANG et al., 2008), entre outros, justificando a importância de realizar estudos dessa natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.
- ANTONIOLI-LUIZON, R.; BARBOSA, C. J.; LARANJEIRA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS-ASTÚA, J. Diagnóstico **da pinta verde / definhamento precoce do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/comunicados/comunicado_132.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estatísticas: Produção agrícola**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira da Indústria de Café, 2010. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#148>>. Acesso em: 13 jan. 2011.
- BALAJI, B.; BUCHOLTZ, D. B.; ANDERSON, J. M. *Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus* quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 11, p. 1386-1392, 2003.
- BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T. **Manual da Leprose**. Araraquara: Fundo de Defesa da Citricultura, 2004. 8 p. (FUNDECITRUS. Manual Técnico).
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220. 2006.
- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V. M.; KITAJIMA, E. W.; KUBO, K. S.; BASSANEZI, R. B.; MACHADO, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem, **Plant Disease**, v. 94, n. 3, p. 284 – 292, 2010.
- BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; De LUIS, A.; VIDAL, E.; PÉRES-PANADÉS, J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal Plant Pathology**, v. 20, n. 2, p. 177-188, 2008.

- BITTANCOURT, A. A. Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 5, p. 185-196, 1934.
- BITTANCOURT, A. A. A mancha anelar, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, v. 4, p. 404-405, 1938.
- BITTANCOURT, A. A. Lesões nas frutas da mancha anelar do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 53-54, 1939.
- BITTANCOURT, A. A. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.22, p.161-231, 1955.
- BITTANCOURT, A. A. A transmissão da leprose dos citrus as folhas e frutas. **O Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 107-117, 1956.
- BOARETTO, M. A C. Transmissão da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, 1939 (Acari Tenuipalpidae) temporariamente mantidos em hospedeiros intermediários, em condições laboratoriais. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 81-93, 1994.
- BOARI, A. J.; PENNER, G.; FILGUEIRAS, S. B. Q.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W. Confirmação da presença da leprose dos citros tipo citoplasmática no Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, Suplemento, p. 207, 2007a, resumo 486.
- BOARI, A. J.; FIGUEIRA, A. R.; NEDER, D. G.; SANTOS, R. C.; GOUSSAIN, M. M.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L. Vírus da mancha anelar do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 2, p. 192-194, 2006.
- BHOHM, J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R., OBWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* their respectives host plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.147, n. 7-8, p. 409-416, 1999.
- BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JÚNIOR, D. de; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005. p. 20-36.

BRIOSO, P. S. T.; CUNHA JUNIOR, J. O.; BONIS, M.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P.; FACCINI, J. L. H. Partial characterization of an isolate of *Citrus leprosis virus* and occurrence of leprosis vector predator, in the State of Rio de Janeiro. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1998, Campinas, **Proceedings...** IOCV, 1998. p.167.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v.25, n. 2, p.169-193, 2000.

CALEGARIO, R. F. Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijsks (Acari: Tenuipalpidae). 2009, 123 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAMBRA, M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; CAPOTE, N. Molecular methods for detection and quantitation of virus in aphids. In: COOPER, I.; KUHNE, T.; POLISCHUK, V. (Eds.). **Virus Diseases and Crop Biosecurity**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 81–88.

CARVAJAL, J. F. **Cafeto – cultivo y fertilización**. Berna/Suíza. Instituto Internacional de La Potasa, 1972, 141 p.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2009). **Archives of Virology**, New York, v.155, n. 1, p. 133-146, 2010.

CHAGAS, C. M. A Associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) à mancha-anular do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 39, p. 229-232, 1973.

CHAGAS, C. M. **Mancha anelar do cafeeiro**: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anatomo-patológicas da espécie *Coffea arabica* L. afetada pela moléstia. 1978, 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHAGAS, C. M. Viroses ou doenças semelhantes transmitidas por ácaros tenuipalpídeos: mancha anelar do cafeeiro e leprose dos citros. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 13, n. 2, p. 92, 1988.

CHAGAS, C. M.; KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Coffee ringspot virus vectored by *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 203-213, 2003.

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

CHIAVEGATO, L. G.; SALIBE, A. A. Prejuízos provocados pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1986, Recife, **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1986b, v. 2, p. 709-718.

CHIAVEGATO, L. G.; MISCHAN, M. M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. **Científica**, v. 15, n. 1/2, p. 17-22, 1987.

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

CHILDERS, C. C.; FRENCH, J. V.; RODRIGUES, J. C. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 5-28, 2003a.

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

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C. M.; GALETTI, S. R.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E. W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of *Citrus leprosis virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n. 2, p.208-213, 1995.

COSTA, F. M.; FREITAS-ASTÙA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E. C.; MACHADO, M. A.; KUBO, K. S.; GONDIN JÚNIOR, M. G. C.; NOVELLI, V. M.; PEREIRA, J. A. Detecção do vírus da mancha anelar do cafeeiro (CoRSV) nas diferentes

fases do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42., 2009, Rio de Janeiro, **Suplemento...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. p. 272, 2009, resumo 919.

COSTE, R. **Le Caféier**. París, Techniques Agricoles et Productions Tropicales, 1968. 310 p.

DOMINGUES, A. D.; RODRIGUES, J. C. V. Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). **Laranja**, v. 20, n. 1, p.35-50, 1999.

FAWCETT, H. S. Report of assistant plant pathologist. **Florida Agricultural Experimental Station Annual Report**, Gainesville, p.75-80, 1909.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIN, L. REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

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

FIGUEIRA, A. R.; REIS, P. R.; CARVALHO, V. I.; PINTO, A. C. S. Vírus da mancha anelar do cafeeiro tem causado prejuízos relevantes aos cafeicultores da região do alto Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., 1995, Ilhéus. **Suplemento...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1995. p. 299, resumo 127.

FLECHTMANN, C. H. W.; OLIVEIRA, C. A. L.; SANTOS, J. M. Aspectos taxonômicos do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis*. In: OLIVEIRA, C. A. L.; DONADIO, L. C. (Eds.) **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 31-36.

FRANCKI, R. I. B.; KITAJIMA, E. W.; PETER, D. Rhabdoviruses. In: KURSTAK, E. **Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. p.455-491.

FREITAS-ASTÚA, J.; CAVALCANTE, M. J. B.; LOCALI, E. C.; ANTONIOLI, R.; LARANJEIRA, F.; DOMINGUES, A. D.; MACHADO, M. A. RT-PCR detection of *Citrus*

leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. **Virus Reviews & Research**, v. 9, Suplemento, p. 246-247, 2004a.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; BASTIANEL, M.; LOCALI, E. C.; ANTONIOLI, R.; MACHADO, M. A. Identification of *Citrus leprosis virus*-nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the State of Rio Grande do Sul. **Virus Reviews & Research**, v. 9, Suplemento, p.247, 2004b.

FREZZI, M. J. **La lepra explosiva del naranjo**. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bela Vista (Corrientes). Buenos Aires, 1940. n. 5, p.1-16 (Boletim de Frutas y Hortalizas).

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Amsterdam v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GONZALES, R. H. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* “complex” with descriptions of the new species from Chile and Thailand (Acari: Tenuipalpidae). **Acarologia**, v. 17, n. 1, p. 81-91, 1975.

GRAY, S. M.; BANERJEE, N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 63, n. 1, p.128-148, 1999.

HASHIMOTO, Y.; VALLES, S. M.; STRONG, C. A. Detection and quantitation of *Solenopsis invicta* virus in fire ants by real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.140, n. 1-2, p.132–139, 2007.

HELLE, W.; BOLLAND, H. R.; HEITMANS, W. R. B. Chromosomes and types of parthenogenesis in false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genética**, v. 54, n. 1, p. 45-50, 1980.

HOGENHOUT, S. A.; AMMAR, E-D.; WHITFIELD, A. E.; REDINBAUGH, M. G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review Phytopathology**. Saint Paul, v. 46, p. 327-359, 2008.

HOHN, T. Plant virus transmission from the insect point of view, **Proceedings of the National Academic of Sciences**, Washington, v. 104, n. 46, p. 17905-17906, 2007.

HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4th. ed. San Diego: Academic Press, 2002, 1056 p.

INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Pulgões, distribuidores de vírus. **Revista Cultivar: Hortaliças e Frutas**, n. 16, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro:.. v. 23, n. 11, p. 54-56, 2010.

JULIATTI, F. C.; BAÓ, S. A.; ARAÚJO, A. C. G; KITAJIMA, E. W.; NEVES, J. B.; PEIXOTO, J. R. Mancha-anular do cafeeiro: etiologia viral e danos em lavouras da região de Araguari (MG). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, suplemento, p. 337, 1995, resumo 365.

KITAJIMA, E. W.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; YUKI, W. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v. 50, p. 254-258, 1972.

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

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

KITAJIMA, E. W.; FERREIRA, P. T. O; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, suplemento, p. 68, 2004.

KITAJIMA, E. W. ; BOARI, A. J.; CHAGAS, C. M. Detecção do vírus da mancha anelar do cafeeiro nos tecidos do ácaro vetor *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, suplemento, p. 135, 2007, resumo 0124.

KITAJIMA, E. W.; CALEGARIO, R. F.; LOCALI-FABRIS, E. C.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F. J. B. *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of

virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, Suplemento, p. 289, 2008, resumo VIR 016.

KITAJIMA, E. W.; RODRIGUES, J. C. V.; FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite transmitted viruses. **Scientia Agricola**, v. 67, n.3, p.348-371, 2010.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; BRAGHINI, M. T.; FAUZUOLI, L. C. C.; LOCALI-FABRIS, E. C.; SALAROLI, R. B. Natural infection of several Coffea species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the Coffee ringspot virus (CoRSV). **Scientia Agricola**. 2011. (no prelo).

KNORR, L. C. Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 15, 1968.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T.; SHIRAKO, Y. The genome structure of Orchid fleck virus shows to be a unique bipartite genome virus that resembles rhabdoviruses. In. INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7th, Edinburgh, 1998. **Proceedings...** [CD-ROM]. Birmingham: British Society for Plant Pathology, 1998.

KONDO, H., MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* transmission, biological properties, and genome structure. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 215–223. 2003.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 8, p. 2413-2421, 2006.

LOCALI-FABRIS, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J. SOUZA, A. A. de; TAKITA, M. A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M. L. P.; MACHADO, M. A Complete sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus* cytoplasmatic type. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 9, p. 2721-2729, 2006.

LOCALI-FABRIS, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J. MACHADO, M. A. *Citrus leprosis virus* C (CiLV-C): Membro-tipo de um novo Gênero de virus de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 16, p. 185-206, 2008.

MAEDA, T.; KONDO, H.; MISUHATA, K.; TAMADA, T. Evidence that Orchid fleck virus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite *Brevipalpus californicus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7. 1998, Edinburg. **Proceedings...** Edinburg, v.3, p. 13-18, 1998.

MAIA, O. M. A.; OLIVEIRA, C. A. L. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas para laranjas através de *B. phoenicis* (Geijskes). **Bragantia**, Campinas, v. 64, n, 3, p. 417-422, 2005.

MANZATO, H. R. H.; FIGUEIREDO, A. F.; SUCHAROV, E. C.; SILVA, G. G.; SILVA, J. A. C.; MARTORANO, L. G.; ANDRÉ, R. G. B.; ANDRADE, W. E. B. Zoneamento agroclimático para a cultura de café no Estado do Rio de Janeiro: Empresa de pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, 2003. 21 p. (PESAGRO-RIO).

MATIELLO, J. B. Novas condições de ocorrência da mancha-anelar do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE PESQUISAS CAFEIRAS, 14., 1987, Campinas, SP: **Anais...** Campinas: IBC/GERCA, 1987. p. 6.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações**. Rio de Janeiro: MAPA/PROCAFÉ – FUNDAÇÃO PROCAFÉ, 2002. 387 p.

MATTOS JÚNIOR, D. de; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JÚNIOR, J. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2005 (IAC. Boletim Técnico, 200).

MENDONÇA, M. J. C. **Biologia comparada de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em diferentes cultivares de café (*Coffea* spp.)**. 2006, 86 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas**. Ribeirão Preto: Holos, 2008, 308 p.

MORENO, A.; FERERES, A.; CAMBRA, M. Quantitative estimation of plum pox virus targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*. **Archives of Virology**, New York, v. 154, n. 9, p. 1391-1399, 2009.

- MUSMECI, M. R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas de leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, v. 15, p. 228, 1963.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 137 p.
- NICOLINI-TEIXEIRA, F. **Leprose do citros: interações planta x vírus x vetor**. 2008, 150 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- NOVELLI, V. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI, E. C.; ARRIVABEM, F.; HILF, M. E.; GOTTWALD, T. R.; MACHADO, M. A. Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39, 2005, Brasília, **Suplemento...**Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2005. p. 183, resumo 768.
- NOVELLI, V. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; LOCALI, E. C.; BASTIANEL, M.; CAZON, R. C.; CARVALHO, S. A.; MENEGUCI, J.; SANDRINI, M.; MORIAS, J. B.; MACHADO, M. A. Ocorrência de leprose dos citros em pomares de Mato Grosso do Sul e Goiás. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 29, 2006. Botucatu, **Suplemento...** Botucatu: Associação Paulista de Fitopatologia, 2006. p. 36.
- NUNES, M. A. **Transmissão do vírus da leprose dos citros por *B. phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) para plantas associadas a pomares cítricos**. 2007, 68 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- OLIVEIRA, C. A. L. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. **Laranja**, v. 7, p. 1-31, 1986.
- OLIVEIRA, C. A. L. Aspectos ecológicos do *Brevipalpus phoenicis*. In: OLIVEIRA, C. A. L.; DONADIO, L. C. (Eds.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 37-48.
- OLMOS, A.; BERTOLINI, E.; GIL, M.; CAMBRA, M. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.128, n. 1-2, p.151-155, 2005.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1–5 and 9. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.141, n. 1, p.22–29, 2007.

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

PICÓ, B.; SIFRES, A.; NUEZ, F. Quantitative detection of *Cucumber vein yellowing virus* in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.128, n. 1-2, p.14-20, 2005.

PINO, F. A.; VEGRO, C. L. R.; FRANCISCO, V. L. F. S.; CARVALHO, F. C. de. A cultura do café no Estado de São Paulo, 1995-96. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 107-167, 1999.

PIO, M. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. IN: MATTOS JÚNIOR, D. de; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **CITROS**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p. 37-60.

POWER, A. G. Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. **Current Opinion in Plant Biology**. New York, v. 3, n. 4, p. 336-340, 2000.

REIS, P. R.; CHAGAS, S. J. R. Relação entre o ataque do ácaro-plano e da mancha-anelar com indicadores da qualidade do café. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v.25, n. 1, p. 72-76, 2001.

RODRIGUES, J. V. C.; BONATO, O.; NOGUEIRA, N. L. Population dynamics of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes on different citrus varieties in Brazil: II Influence of citrus variety. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 1997, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Londrina: EMBRAPA/CNPQSO, 1997. Book 1, v. 26, n. 2, p. 343-344.

RODRIGUES, J. C. V.; KITAJIMA, E. W.; CHILDERS, C. C.; CHAGAS, C. M. *Citrus leprosis virus* vectored by *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brasil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 161-179, 2003.

ROSSETI, V. A leprose dos citros no Brasil. In: OLIVEIRA, C. A. L.; DONADIO, L. C. (Eds.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.1-12.

RUIZ-RUIZ, S.; MORENO, P.; GUERRI, J.; AMBRÓS, S. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.145, n. 2, p.96-105, 2007.

SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R. K. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan[®]). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.147, n. 1, p.43-53, 2008.

SCHNEIDER, W. L.; SCHERMAN, D. J.; STONE, A. L.; DAMSTEEGT, V. D.; FREDERICK, R. D. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.120, n. 1, p.97-105, 2004.

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

STANGE, C. Plant-virus interactions during the infective process. **Ciência e Investigação Agraria**, Santiago, v. 33, n. 1, p. 1-18, 2006.

THOMAZIELLO, R. A.; FAZUOLI, L. C.; PEZZOPANE, J. R. M.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. **Café arábica**: cultura e técnicas de produção. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2000. 82 p. (IAC. Boletim Técnico, 187).

TRINDADE, M. L. B. **Caracterização biológica dos ácaros *Brevipalpus obovatus* Donnadieu, 1875, *Brevipalpus californicus* (Banks, 1904) e *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) no Estado de São Paulo**. 1990. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TSAI, C.-W. **The molecular basis of the interactions of rhabdoviruses with their insect and plant hosts**. 2006. 170 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Graduate Scholl, Ohio State University, Ohio.

VERGANI, A. R. La transmisión de la lepra explosiva de la ligustrina por ácaros. **Revista Argentina de Agronomía**. Buenos Aires, v. 9, p. 292-294, 1942.

VERGANI, A. R. **Transmission y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo**. Buenos Aires: Instituto de Sanidad Vegetal. 1945. 11p. (Serie A5, n. 3).

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

WHITFIELD, A. E.; ULMAN, D. E.; GERMAN, T. L. Tospovirus-thrips interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 459-489, 2005.

ZHANG, X.; WANG, X.; GUANGHE, Z. A one-step real-time RT-PCR assay for quantifying *Rice strip virus* in rice and in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus* Fallen). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p.181-187, 2008.

Capítulo II

**Detecção e quantificação do *Citrus leprosis virus C* em *Brevipalpus phoenicis*
por qPCR**

1 **Detecção e quantificação do *Citrus leprosis virus C* em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)**
2 **(Acari: Tenuipalpidae) por qPCR**

3

4 Frank Magno da Costa^{1,2}, Marinês Bastianel², Juliana Freitas-Astúa^{2,5}, Marcos A. Machado²;
5 Elliot W. Kitajima³, Maria A. Nunes², Karen S. Kubo^{2,4} & Manoel G. C. Gondin Júnior.¹

6

7 ¹Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de
8 Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil, ²Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’, Instituto
9 Agrônômico de Campinas, 13490-970, Cordeirópolis, SP, Brasil, ³Núcleo de apoio à Pesquisa
10 em Microscopia Eletrônica, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’. 13418-900,
11 Piracicaba, SP, Brasil, ⁴Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970,
12 Campinas, SP, Brasil, ⁵Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Empresa
13 Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil

14

15 Autor para correspondência: Frank M. Costa, e-mail: fmcosta1@yahoo.com.br

16

17 **RESUMO**

18 A leprose dos citros é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) e transmitida por
19 *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). As interações envolvidas são extremamente complexas e os
20 mecanismos envolvidos nestas interações têm sido parcialmente elucidados. O objetivo deste
21 trabalho foi determinar o tipo de relação entre CiLV-C e *B. phoenicis*, através de testes de
22 transmissão, técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e reação em cadeia da
23 polimerase quantitativo em tempo real (qPCR). Fêmeas adultas de *B. phoenicis* avirulíferas
24 foram submetidas ao período de acesso para a aquisição (PAA) do CiLV-C durante cinco
25 dias. Em seguida, foram transferidas para os seguintes hospedeiros: feijão-de-porco (não
26 hospedeira do vírus), fruto de laranja Pêra sintomático e fruto de laranja Pêra sadio. Em
27 seguida, foram coletadas em diferentes tempos (0; 7 ; 14 e 21 dias) após a infestação,
28 constituindo-se em diferentes tratamentos. A qPCR revelou que não houve aumento da carga
29 viral, independentemente do tempo de confinamento nos diferentes tratamentos. A MET não
30 detectou partículas de CiLV-C. A transmissão foi de 83, 75 e 58% para os tratamentos fruto
31 de laranja sintomático, feijão-de-porco e frutos de laranja sadio, respectivamente. Os
32 primeiros sintomas foram observados aos 30±5 dias após o confinamento dos ácaros. Estes

33 resultados indicam que o tipo de interação entre o CiLV-C e *B. phoenicis* é persistente
34 circulativa, não propagativa.

35

36 **Palavras-chave:** Citros, leprose, ácaro, transmissão, vírus-vetor.

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 **ABSTRACT**66 **Detection and quantitation of *Citrus leprosis virus C* in the *Brevipalpus phoenicis***
67 **(Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) by qPCR**

68

69 The citrus leprosis disease is caused by *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) and
70 transmitted by *Brevipalpus phoenicis*. The interactions virus-vector are extremely complex
71 and the mechanisms involved in this interactions have been partially elucidated. The aim of
72 this study was to determine the type of relationship established between CiLV-C and *B.*
73 *phoenicis* through assays transmission, transmission electron microscopy (TEM) and real time
74 quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Adult females of *B. phoenicis* were submitted
75 to acquisition access period (AAP) of virus during five days. After this time they were
76 transferred to the following treatments: mungbean (*Canavalia ensiformis*, non-host of the
77 virus), symptomatic fruit orange Pêra and healthy fruit orange Pêra. In next, was collected in
78 different periods: 0; 7; 14 and 21 days after infestation, constituted in different treatments.
79 The qPCR revealed no increase in viral titer over the time in any of the treatments evaluated.
80 In TEM, it was not possible to detect particles of CiLV-C. The transmission was 83, 75% and
81 58% for the treatments symptomatic fruit orange, mungbean and healthy fruit orange,
82 respectively. The first symptoms were observed 30±5 days after the mites infestation. These
83 results indicate that the interactions type between CiLV-C and *B. phoenicis* is of type
84 persistent circulative, non-propagative.

85

86 **Keywords:** Citrus, leprosis, transmission virus-vector.

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

INTRODUÇÃO

97

98

99

100 A ocorrência da leprose tem ocasionado redução na produtividade da citricultura
101 brasileira. Esta doença é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) e transmitido por
102 *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Atualmente no Brasil, cerca de 10 a
103 15% do custo de produção de variedades de laranja doce corresponde à aplicação de
104 acaricidas visando o controle do *B. phoenicis* (MAIA; OLIVEIRA, 2005; RODRIGUES et al.,
2005).

105

106

107

108

109

Problemas acarretados por ácaros do gênero *Brevipalpus* e pelos vírus a estes
associados (vírus transmitidos por *Brevipalpus*-VTB) representam uma ameaça crescente. Até
1990 eram conhecidos, cinco VTB. Hoje este número aumentou significativamente, chegando
a aproximadamente 40. Isto mostra a importância crescente do grupo (KITAJIMA et al.,
2003; KITAJIMA et al., 2010).

110

111

112

113

114

115

Os sintomas causados pelos VTB ocorrem de maneira localizada tanto em folhas
quanto em ramos e frutos. São expressos na forma de manchas foliares, geralmente cloróticas
e algumas vezes anelares, com pontos necróticos no centro da lesão, de coloração
amarronzada. Podem ocasionar queda prematura de folhas e frutos. Quando em alta
incidência e severidade pode reduzir a vida útil de uma planta (BASSANEZI; YAMAMOTO,
2004; BASTIANEL et al., 2010).

116

117

118

Diferentes interações ocorrem entre a planta, o vírus e cada estágio do ciclo de vida do
vetor. Tais interações apresentam particular interesse tanto do ponto de vista epidemiológico,
quanto para o estabelecimento de novas medidas de controle de viroses (HULL, 2002).

119

120

121

122

123

124

O entendimento do processo de transmissão requer considerações detalhadas, que
envolvem os aspectos de aquisição, relações vírus-vetor, inoculação e desenvolvimento da
doença. Técnicas de imunocitoquímica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e PCR
quantitativo em tempo real (qPCR) são ferramentas poderosas para o entendimento das
interações existentes entre os vírus e seus vetores (BERTOLINI et al., 2008; ULLMAN et al.,
1993).

125

126

127

128

129

A quantificação de patógenos através da técnica de qPCR tem sido amplamente
utilizada. De acordo com Clementi et al., (1993) diferentes metodologias de quantificação
tem sido empregadas no estudo de vírus persistente. A quantificação deve ser realizada nas
situações em que se faz necessário determinar o número absoluto de cópias da sequência
alvo. Na literatura é possível encontrar diversos estudos onde se faz a quantificação absoluta

130 de patógenos no interior do vetor, com a técnica de qPCR (BERTOLINI et al., 2008;
131 SAPONARI et al., 2008).

132 Ullman et al. (1993) comprovou por MET a presença de viroplasmas em ninfas de
133 *Frankliniella occidentalis* (Pergande), e ainda testes imunocitoquímicos revelaram a
134 existência desta NS ligada a células epiteliais do intestino médio do vetor e em vírions de
135 plantas infectadas. Esses resultados indicam que o TSWV consegue replicar no interior do
136 vetor, tendenciando portanto, a uma interação do tipo persistente propagativa (WHITFIELD
137 et al., 2005).

138 De acordo com os conhecimentos atuais, acredita-se que no patossistema CiLV-C x *B.*
139 *phoenicis* a transmissão é do tipo persistente circulativa, não propagativa, contudo muitas
140 dúvidas ainda persistem nesta tese. Portanto, os objetivos deste trabalho são: (I) estimar se há
141 aumento na quantidade de partículas do CiLV-C no interior de *B. phoenicis* ao longo do
142 tempo por qPCR; (II) verificar se o CiLV-C forma inclusões (viroplasmas) no interior
143 (citoplasma) de células do ácaro vetor por meio de MET; (III) verificar se após a aquisição o
144 ácaro permanece infectivo, mesmo quando permanece em plantas não-hospedeira do vírus.

145

146

MATERIAL E MÉTODOS

147

Obtenção e criação da população de *Brevipalpus phoenicis*

148

149 Frutos de laranja Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] no estágio de desenvolvimento
150 conhecido como “bola de tênis” foram coletados em pomares do Centro APTA Citros ‘Sylvio
151 Moreira’ (CAPTACSM) (22°32 S, 47°27 O) de uma área sem histórico de ocorrência da
152 leprose. Os frutos foram transportados para o Laboratório de Acarologia e lavados em água
153 corrente, com o auxílio de uma esponja para retirada de resíduos, ovos e formas ativas de
154 artrópodes vindos do campo e finalmente expostos ao ar para secagem. Em seguida, foram
155 imersos até 1/3 de sua área em parafina na forma líquida mantida à temperatura de
156 aproximadamente 50°C. Após a secagem, no limite entre a área tratada e não tratada foi
157 colocada cola entomológica Tanglefoot com a finalidade de evitar o escape dos ácaros
158 (CHIAVEGATO, 1986). A superfície do fruto não tratada com a parafina recebeu uma
159 mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina na proporção de 1:1:2, umedecida em água, cuja
160 finalidade foi servir como substrato para oviposição (RODRIGUES et al., 2007). Finalmente,
161 ácaros avirulíferos foram transferidos para o fruto, com o auxílio de um pincel de poucos
162 pêlos, e mantidos em uma sala a 25±1°C, umidade relativa ar de 60±5% e fotofase de 10 h. A
163

164 criação foi estabelecida de acordo com a metodologia desenvolvida por Chiavegato, 1986a, a
165 partir de uma população de *B. phoenicis* mantida no Laboratório de Acarologia do Centro
166 APTA Citros 'Sylvio Moreira' (CAPTACSM). A confirmação de que estes eram avirulíferos
167 foi realizada por RT-PCR convencional, usando os primers de Locali et al., (2003).

168

169 **Aquisição do vírus pelo vetor**

170

171 Frutos de laranja Pêra com sintomas típico de leprose (lesões novas) foram colhidos
172 em pomares do CAPTACSM e preparados conforme mencionado no item anterior. Ácaros
173 avirulíferos provenientes da população citada no item anterior foram transferidos para estes
174 frutos e submetidos a um período de acesso à aquisição (PAA) do vírus de cinco dias. Após
175 este período uma amostra de dez ácaros foram coletados de cada fruto e transferidos para
176 microtubos de centrífuga de 1,5 mL, para posterior extração do ácido ribonucléico (RNA),
177 síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase (PCR), a fim de confirmar se estes haviam
178 adquirido o vírus.

179 Após o PAA e confirmada a aquisição do vírus pelo vetor, os ácaros foram
180 transferidos para os tratamentos: planta de feijão-de-porco (hospedeiro apenas do vírus), fruto
181 de laranja Pêra sintomático e frutos de laranja Pêra sadio. Em seguida foram coletadas em
182 diferentes tempos (0; 7 ; 14 e 21 dias) após a infestação, constituindo-se em diferentes
183 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de três repetições. Todos os tratamentos foram
184 periodicamente inspecionados para o acompanhamento da oviposição e retirada dos ovos,
185 com a finalidade de evitar que ácaros das gerações subsequentes fossem coletados e assim não
186 mascarar os resultados.

187

188 **Isolamento do RNA total e síntese de cDNA**

189

190 Após o período de acesso à aquisição, cinco amostras de 10 ácaros virulíferos foram
191 coletados em cada tratamento e transferidos para microtubos de centrífuga de 1,5mL e
192 armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise via qPCR. O isolamento do RNA total
193 do vírus foi realizado para os ácaros coletados em cada tratamento e tempo de coleta,
194 utilizando o RNeasy Plus Micro Kit[®] (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Após o
195 isolamento, o RNA foi ressuspendido em 20µL de água livre de RNase, quantificado em
196 Nanodrop ND 8000 (Thermo Scientific) e armazenado em freezer à -80°C.

197 O cDNA foi sintetizado a partir de 20 ng da fita molde do RNA de cada amostra
198 utilizando o First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) em duas etapas, seguindo as
199 recomendações do fabricante, descritas a seguir: em um tubo de microcentrífuga com
200 capacidade para 0,5 mL adicionou-se 11,5 µL de RNA + água tratada com DEPC
201 (Dietilpirocarbonato) e 1µL de random hexamer primer (Fermentas). As amostras foram
202 submetidas a temperatura de 70°C por 5 minutos e então colocadas imediatamente no gelo.
203 Posteriormente adicionou-se 4µL do tampão de reação da Revertaid (5x), 0,5µL da ribolock™
204 RNase inhibitor (Fermentas), 2µL de dNTP (2,5mM) e 1µL da Revertaid™ H minus reverse
205 transcriptase (Fermentas). O volume total da reação foi de 20µL. A reação foi incubada a
206 37°C por 1 hora e 30 minutos. Ao término da reação, as amostras foram armazenadas em
207 freezer a -80 °C.

208

209 **Construção das curvas-padrão para o CiLV-C**

210

211 Para a obtenção da curva-padrão para uma região do gene que codifica a Helicase
212 (gene *Hel*), foram utilizadas soluções de plasmídeo, contendo o respectivo inserto. O RNA
213 viral foi amplificado através de transcrição reversa e PCR convencional, utilizando *primers*
214 externos. Em seguida o produto da PCR foi clonado por meio de ligação a um plasmídeo
215 contendo promotor T7 e replicado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 alpha.
216 Posteriormente, foram selecionadas cerca de 5 a 10 colônias que apresentavam o plasmídeo
217 recombinante e o cDNA isolado por meio de miniprep. O passo seguinte foi identificar as
218 colônias que apresentavam o inserto (segmento alvo), este foi realizado por meio da
219 observação do crescimento bacteriano, uma vez que se usou o CloneJET™ PCR Cloning Kit
220 (Fermentas). A equação de regressão para o gene estudado (*Hel*), foi calculada com o auxílio
221 do programa Microsoft Office Excell®, 2007.

222 A concentração do DNA plasmidial foi determinada através de espectrofotômetro
223 Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific). Os parâmetros utilizados para converter a
224 concentração obtida em ng/uL para número de moléculas/uL foram os seguintes: PM médio
225 de 1 kb de ssRNA = 330 g/mol; 1 mol = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas. O DNA foi submetido a
226 diluições seriadas de uma solução estoque do plasmídeo contendo o inserto do gene. O fator
227 de diluição foi de [1:10], e as diluições são descritas a seguir: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000,
228 1:10.000, 1:100.000, 1:1000.000; 1:10.000.000; 1:100.000.000; 1:1.000.000.000.

229 A curva-padrão foi obtida por meio de quantificação absoluta, utilizando o 7500 Fast
230 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicata a

231 um volume de 20 µL, contendo 2 µL da solução do plasmídeo, 0,8 µL do conjunto (*primers*
232 mais sonda), 7,2 µL de H₂O milli-Q filtrada e autoclavada e 10 µL de TaqMan[®] Fast
233 Universal PCR MasterMix (2X) da Applied Biosystems. As condições térmicas de ciclagem
234 da curva-padrão foram: 95°C por 20 segundos, 95°C por 03 segundos e 40 ciclos de 15
235 segundos e 60°C por 30 segundos a cada ciclo, num total de 40 ciclos, tendo duração de
236 aproximadamente 45 minutos. A curva padrão foi gerada pela amplificação de cada diluição.
237 A faixa linear de abrangência da curva padrão foi de seis ordens de magnitude. A eficiência
238 da amplificação foi determinada pela seguinte fórmula: $(E = 10^{(-1 / slope)} - 1) \times 100$). A
239 determinação do número inicial de moléculas/mL da solução estoque e a conversão para
240 número de transcrito foi realizada de acordo com Bertolini et al. (2008).

241

242 **Ensaio quantitativo da reação em cadeia da polimerase – qPCR**

243

244 O conjunto de sonda e *primers* utilizados neste teste foram os mesmos utilizados por
245 Nicolini-Teixeira (2008b), desenhados via software Primer-Express (Applied Biosystems).
246 Para a detecção do gene *Hel* do CiLV-C, foram utilizados os *primers Hel-F* (5'-
247 CAAGATACCCGTTGATGGTTCTGA-3') e *Hel-R* (5'-
248 GCATTAAGCGTCGTTATCCTGATTT-3'), desenhados a partir do número de acesso do
249 GenBank DQ352194. A sonda (5-'ACGGCAATCGACTTCT-3'), também obtida a partir do
250 mesmo acesso do GenBank, foi marcada com o fluoróforo MGB FAM, e desenhada pelo
251 Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems). A detecção e quantificação
252 do número de partículas do CiLV-C foi realizada com um volume final da reação de 20µL,
253 contendo 2µL do cDNA; 10µL do MasterMix TaqMan[®] Fast Universal PCR (2X) (Applied
254 Biosystems); 0,8µL do conjunto *primers* mais sonda e 7,2µL de H₂O Milli-Q filtrada em filtro
255 Millipore e autoclavada. As reações foram executadas utilizando o 7500 Fast Real-Time PCR
256 System (Applied Biosystems). Em cada placa foi realizada a curva-padrão, conforme descrita
257 em item a seguir. Para cada amostra foram realizadas reações em triplicatas técnicas. Os
258 controles utilizados foram constituídos por: (i) Controle positivo – cDNA proveniente de
259 ácaros virulíferos; (ii) Controle negativo - cDNA proveniente de ácaro avirulíferos e (iii)
260 Branco - água Milli-Q filtrada e autoclavada, sem a adição de cDNA. As condições térmicas
261 de ciclagem foram as mesmas para as amostras citadas anteriormente. O gene 18S foi
262 utilizado como controle endógeno visando normalizar as amostras das possíveis diferenças de
263 concentrações de cDNA.

264 A detecção do CiLV-C no interior de *B. phoenicis* foi realizada para todos os
265 tratamentos avaliados através da análise do parâmetro *Ct* (*Cycle threshold*). Este parâmetro é
266 definido como o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a
267 linha threshold (limiar da detecção). Os valores de *Ct* são logarítmicos e usados diretamente
268 (método *Ct* comparativo) ou indiretamente (interpolação para curvas padrões para criar
269 valores lineares) para as análises quantitativas.

270

271 **Aspectos biológicos da interação CiLV-C / *Brevipalpus phoenicis***

272

273 Três amostras de 10 ácaros virulíferos, provenientes de cada tratamento descrito
274 anteriormente, foram coletadas ao acaso e transferidas para plantas de laranja Pêra sadia,
275 altamente suscetível ao vírus. As plantas utilizadas para o estudo de transmissão do CiLV-C
276 foram provenientes de sementes e no momento da montagem do experimento encontravam-se
277 com aproximadamente 6 meses de idade. Foram utilizadas três repetições, sendo que cada
278 repetição foi constituída de uma única planta. As folhas submetidas à infestação pelos ácaros
279 recebiam uma mistura de farinha, areia fina e gesso como substrato para oviposição. Depois
280 de infestadas por ácaros virulíferos, as plantas eram mantidas em casa de vegetação e
281 semanalmente inspecionadas quanto à presença ou ausência dos sintomas da leprose, por um
282 período de quatro meses.

283

284 **Detecção do CiLV-C por microscopia eletrônica de transmissão – MET**

285

286 Ácaros adultos virulíferos foram enviados ao Núcleo de apoio à Pesquisa em
287 Microscopia Eletrônica - NAP/MEPA da Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ –
288 ESALQ / USP, para serem analisados por MET. Os ácaros foram mergulhados em uma
289 solução com 3% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, contendo 1,8% de
290 sacarose. Para facilitar a penetração dos reagentes, a extremidade terminal do opistosoma foi
291 seccionado sob lupa estereoscópica. Após um mínimo de 1 h de fixação, os ácaros foram
292 lavados na solução do tampão carreador e posfixados em uma solução de OsO₄ 1% no mesmo
293 tampão por 1 hora. Seguiu-se uma desidratação em solução crescente de concentração de
294 acetona (30, 50, 70, 90%), 10 min cada e três vezes em solução a 100%. As amostras foram
295 infiltradas em uma solução acetona/resina epóxica Spurr (1:1) por 5-6 horas e na resina pura
296 por uma noite. Os ácaros foram emblocados em formas de silicone e a resina foi polimerizada
297 por 2 dias. Os blocos foram seccionados em ultramicrótomo Leica UC6 equipado com

298 navalha de diamante e as secções coletadas em retículos de cobre de 3 mm de diâmetro, e 100
299 mesh de malha, coberta com filme de Formvar. As secções foram contrastadas com acetato de
300 uranila 3% e citrato de chumbo de Reynold.

301

302 **Análise dos dados**

303

304 A plotagem da intensidade de fluorescência versus o número de ciclos foi realizada
305 automaticamente pelo software que fornece o valor do *Ct*. A média dos valores dos *Ct* e do
306 desvio padrão (S.D.) foi calculada para as triplicatas de cada amostra experimental. O
307 coeficiente de variação (C.V.%) dentro e entre amostras foi calculado como a porcentagem do
308 desvio padrão (S.D.%) em comparação com o valor médio do *Ct*.

309 A estatística foi realizada por meio da análise de variância pelo programa estatístico
310 Assistat Versão 7.6 beta, desenvolvido por Silva; Azevedo (2002).

311

312 **RESULTADOS**

313

314 A aquisição do CiLV-C pelo ácaro *B. phoenicis* ocorreu de maneira eficiente após o
315 PAA de 5 dias (Figura 1), uma vez que todas as amostras teste foram positivas por PCR
316 convencional.

317 O valor da concentração do DNA plasmidial fornecido pelo espectrofotômetro foi 560
318 ng/ μ L. A linearização da quantificação do DNA plasmidial forneceu um valor de cerca de 10^9
319 cópias/ μ L do inserto do gene *Hel* do CiLV-C, cujo tamanho é de 849pb. A partir das diluições
320 seriais e com base neste resultado foi possível a determinação dos pontos de detecção em Log.
321 do número de moléculas que foram de $1,91 \times 10^9$; 15×10^8 ; $1,43 \times 10^6$; $1,71 \times 10^5$; $1,3 \times 10^1$ cópias
322 da sequência alvo do CiLV-C, sendo que este último foi considerado como o ponto limite de
323 detecção.

324 O valor da inclinação da curva obtida neste trabalho em função dos valores de *Ct* foi
325 de -4.1437 e o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9878, ambos gerados pela curva padrão
326 (Figura 2). A eficiência da amplificação alcançada em qPCR foi de 1,02 ou 102%.

327 A análise de variância revelou diferença estatística entre os valores médios de *Ct*
328 (Tabela 1), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), reforçando a análise
329 qualitativa da cinética de amplificação da sequência alvo, indicando a inexistência de aumento
330 no número de partículas virais nos tratamentos estudados.

331 Os perfis de amplificação gerados (Figura 3B, 4B e 5B) a partir de uma sequência alvo
332 do ssRNA transcrito de CiLV-C extraído do ácaro vetor, em diferentes tempos e tratamentos,
333 não apresentaram aumento no número de cópias do vírus. Ao contrário, ocorreu redução no
334 número de partículas virais.

335 Os primeiros sintomas típicos de leprose foram observados aos 30±5 dias após a
336 transferência dos ácaros para plantas de citros sadias. Lesões locais, circulares, lisas e
337 cloróticas iniciaram em folhas de apenas uma planta nas quais os vetores do CiLV-C eram
338 provenientes dos hospedeiros planta de feijão-de-porco e fruto de laranja Pêra sintomático,
339 ambos do tempo 1 de coleta (Tabela 2). Posteriormente, pequenas manchas amareladas e/ou
340 cloróticas inicialmente lisas que com a evolução da doença tornaram-se corticosas foram
341 observadas em ramos.

342 O aumento na incidência dos sintomas foi observado após 60±5 dias da transferência
343 dos ácaros para plantas de citros sadias, nos três hospedeiros investigados. Analisando cada
344 hospedeiro separadamente, observa-se que aos 60±5 dias, no tratamento planta de feijão-de-
345 porco e tempo 2, houve maior expressão de sintomas, pois todas as três plantas infestadas
346 desenvolveram a doença. No tratamento fruto de laranja Pêra sintomático, nota-se que nos
347 tempos de coleta 3 e 4, todas as plantas infestadas apresentaram sintomas característicos de
348 leprose aos 90±5 dias. No tratamento fruto de laranja Pêra sadio, apenas no tempo 3 todas as
349 plantas desenvolveram sintomas da doença.

350 Observou-se ainda, em frutos de laranja Pêra sintomático, que das 12 plantas
351 infestadas com ácaros virulíferos, 10 (83,33%) desenvolveram lesões típicas de leprose. Esse
352 comportamento foi seguido pelos tratamentos planta de feijão-de-porco e frutos de laranja
353 Pêra sadio, com 9 (75%) e 7 (58,33%) de plantas com leprose, respectivamente.

354 No exame ao MET não foi possível a observação de efeitos citopáticos característicos
355 dos VTB-C: partículas em forma de bastonetes no citoplasma, como previamente observado
356 em amostras de *B. phoenicis* coletados diretamente de citros infectados.

357

358

DISCUSSÃO

359

360 No tratamento planta de feijão-de-porco houve uma redução no número de partículas
361 virais e, com conseqüente aumento no número de *Ct*. Este fato sugere que a interação entre o
362 vírus da leprose e seu vetor é circulativa.

363 No tratamento fruto de laranja Pêra sintomático (Figura 4B), os valores de *Ct* foram
364 menores que os *Cts* dos tratamentos planta de feijão-de-porco e fruto de laranja Pêra sadio.

365 Isto pode estar relacionado ao maior PAA, uma vez que se tratava de inóculo constante, ou
366 seja, o ácaro teve contato com o vírus durante todo o tempo que durou o experimento,
367 possibilitando perda e reaquisição de partículas.

368 No tratamento fruto de laranja Pêra sadio (Figura 5B), também observou-se redução
369 do número de cópias do alvo, reforçando a ausência de multiplicação do vírus no ácaro.

370 Trabalhos prévios sugerem que o CiLV-C apenas circula no vetor, isto porque não foi
371 encontrado aumento na carga viral, uma vez que os carga viral ficaram muito próximos entre
372 si (NICOLINI-TEIXEIRA, 2008b). No entanto, o autor não estabeleceu qualquer tipo de
373 associação com os aspectos biológicos de transmissibilidade, como por exemplo, eficiência de
374 transmissão. Por isso, neste trabalho foi realizado estudos dessa natureza e ficou comprovado
375 que o ácaro foi capaz de adquirir e transmitir o vírus na fase adulta, indicando ausência de
376 replicação, uma vez que o tempo envolvido desde a aquisição até a transmissão foi baixo.

377 Na tentativa de quantificar comparativamente o CiLV-C tanto na planta, quanto no
378 ácaro, observou-se que a quantidade de partículas virais não aumentou, mesmo após 28 dias
379 de aquisição do vírus pelo vetor. Quando a quantificação foi realizada a partir de CiLV-C
380 extraído de plantas, houve uma diferença de 15 *Cts* (citros sintomáticos *Ct* 25 x ácaros
381 virulíferos *Ct* 10 (NICOLINI et al., 2008a).

382 Sabe-se que para o tipo de interação vírus-vetor do modo persistente circulativa ou
383 propagativa, um tempo ou período latente é requerido para que o vetor seja capaz de
384 transmitir o vírus (HOGENHOUT et al., 2008). No modo de transmissão persistente
385 circulativa o período latente varia de algumas horas a dias. Na transmissão do tipo persistente
386 propagativa o vírus pode permanecer em latência por semanas ou até mesmo meses (HULL,
387 2002).

388 Kitajima et al. (2008) comprovaram por MET a presença de partículas do CiLV-C
389 entre as membranas e células adjacentes ao intestino médio do ácaro. Entretanto, não se
390 observou a formação de viroplasma (sítio de replicação do vírus) no interior do mesmo, dando
391 suporte a sugestão de que o referido vírus apenas circula em *B. phoenicis*.

392 Plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) apresentaram lesões necróticas
393 induzidas por CiLV-C cinco dias após serem submetidas a infestação com larvas virulíferas
394 de *B. phoenicis*, confirmando, portanto, que no estágio larval o ácaro é capaz de adquirir e
395 transmitir o vírus (E.W. Kitajima, *comunicação pessoal*). Considerando-se que o estágio
396 larval de *B. phoenicis* dura algo em torno de 8 dias, somando-se a fase ativa ($5,2 \pm 2,3$ dias) à
397 fase quiescente ($2,9 \pm 0,6$ dias), incluindo ainda o PAA que pode variar de 1-2 dias, então a
398 probabilidade do vírus replicar-se no interior do ácaro diminui substancialmente, uma vez que

399 para haver replicação, o vírus necessita de um período de incubação (latência) que pode variar
400 entre 4 a 60 dias (HOGENHOUT, 2008; HULL, 2002; MENDONÇA, 2006). Dessa forma, o
401 modelo (persistente circulativo - não propagativo) seria o que melhor se ajusta a tais
402 circunstâncias.

403 A impossibilidade de detecção do CiLV-C em *B. phoenicis* nas amostras de ácaros
404 examinados por MET, provavelmente deve-se ao fato da baixa quantidade de partículas
405 adquiridas pelo vetor a ponto de poder ser visualizada. Menciona-se ainda que os resultados
406 obtidos por Calegario (2009) quando examinou por MET 30 ácaros provenientes de colônias
407 mantidas em plantas infectadas por CiLV-C, as partículas do vírus estavam presentes em
408 apenas metade dos indivíduos examinados, fato este atribuído a baixa aquisição.

409 Nas condições de realização deste trabalho e baseado nos resultados de MET
410 (KITAJIMA et al., 2008; CALEGARIO, 2009) que sugerem ausência de viroplasma no ácaro.
411 qPCR (FREITAS-ASTÚA et al., 2008; NICOLINI, 2008; NICOLINI-TEIXEIRA, 2008)
412 mostraram haver diminuição da carga viral, ao longo do tempo. Sustentado num período
413 relativamente curto requerido pelo vírus para ser transmitido pelo ácaro (BASSANEZI, 2004).
414 Os resultados aqui gerados estão em acordo com os autores supracitados, evidenciando assim
415 relação persistente circulativa, não-propagativa para o patossistema CiLV-C x *B. phoenicis*.

416

417

AGRADECIMENTOS

418

419 Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –
420 FAPESP, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, à
421 Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE e à
422 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pelo auxílio financeiro para a
423 realização deste trabalho.

424

425

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

426

427 BASTIANEL M, NOVELLI V M, KITAJIMA E W, KUBO KS, BASSANEZI RB,
428 MACHADO MA, FREITAS-ASTÚA J (2010) Citrus Leprosis: centennial of an unusual
429 mite-virus pathosystem, **Plant Disease**, 94:284 – 292.

430 BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T. **Manual da Leprose**. Araraquara: Fundo de Defesa
431 da Citricultura, 2004. 8 p. (FUNDECITRUS. Manual Técnico).

- 432 BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; De LUIS, A.; VIDAL, E.;
433 PÉRES-PANADÉS, J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant
434 tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal Plant Pathology**, v.120,
435 p. 177-188, 2008.
- 436 CALEGARIO, R.F. Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e
437 do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijsks (Acari: Tenuipalpidae). 2009, 124 f. Tese
438 (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura
439 ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba.
- 440 CHIAVEGATO, L. G. Biologia de *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária**
441 Brasileira, Brasília, v. 21, n.8, p. 813-816, 1986a.
- 442 FREITAS-ASTUA, J.; NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; KITAJIMA, E.W.; Interações entre
443 o vírus da leprose dos citros e seu vetor *Brevipalpus phoenicis*. **Summa Phytopathologica**, v.
444 34, p.128- 130, 2008.
- 445 CLEMENTI, M.; MENZO, S.; BAGNARELLI, P. MANZIN, A.; VALENZA, A.;
446 VARALDO, P. Quantitative PCR and RT-PCR in virology, **Genome Research**, v. 2, p. 191-
447 196, 1993
- 448 HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E.D.; WHITEFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect
449 vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology**,
450 Palo Alto, v. 46, p. 327-359, 2008.
- 451 HULL, R. **Matthew’s Plant Vitology**. 4th. ed. San Diego, Califórnia, 2002, p. 485-531.
- 452 KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant
453 virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and**
454 **Applied Acarology**, v.30, n. 1-3, p.135-160, 2003.
- 455 KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.;
456 BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of
457 CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of
458 virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant**
459 **Pathology**, Lavras, v. 33, Suplemento..., p. 289, 2008.

- 460 KITAJIMA, E.W., RODRIGUES, J.C.V., FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of
461 ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite transmitted viruses. **Scientia**
462 **Agricola**, v. 67, n.3, p.348-371, 2010.
- 463 LOCALI, E.C., FREITAS-ASTUA, J., SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., ASTUA-MONGE,
464 G., ANTONIOLI, R., KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. Development of a molecular
465 tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas.
466 **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n. 11, p. 1317-1321, 2003.
- 467 MAIA, O.M.A.; OLIVEIRA, C.A.L. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas,
468 quebra-ventos e plantas daninhas para laranjas através de *B. phoenicis* (Geijskes). **Bragantia**,
469 Campinas, v. 64, n, 3, p. 417-422, 2005.
- 470 MENDONÇA, M.J.C. **Biologia comparada de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939)**
471 **(Acari: Tenuipalpidae) em diferentes cultivares de café (*Coffea* spp.)**. 2006, 86 f.
472 Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 473 NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; SCHONS, J.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E.C.;
474 PEREIRA, J.A.; KUBO, K.S.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. FREITAS-ASTÚA, J.
475 Comparação entre os títulos de vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* por RT-qPCR. In:
476 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42, 2008, Belo Horizonte,
477 **Suplemento...**Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. p. 287, 2008a.
- 478 NICOLINI-TEIXEIRA, F. **Leprose dos citros: interações planta x vírus x vetor**. 2008b,
479 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- 480 RODRIGUES, J.C.V.; LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.
481 Transmissibility of Citrus leprosis virus by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaefolium*.
482 **Plant Disease**, v.89, n.8, p.911, 2005.
- 483 RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.S.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.;
484 NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização
485 da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. *Laranja*, v. 28, n. 1-2, 2007.
- 486 SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R.K. quantitative detection of Citrus tristeza
487 virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan[®]). **Journal of**
488 **Virological Methods**, Amsterdam, v.147, p.43-53, 2008.

- 489 SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat
490 para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**,
491 Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- 492 ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L.; SHERWOOD, J.L.; WESTCOT, D.M.; CANTONE, F.A.
493 Tospovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the
494 nonstructural protein encoded by the S RNA of *Tomato spotted wilt tospovirus* is present in
495 thrips vector cells. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n.4, p. 456–463,1993.
- 496 WHITFIELD, A.E.; ULMAN, D.E.; GERMAN, T.L. Tospovirus-thrips interactions. **Annual**
497 **Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 459-489, 2005.

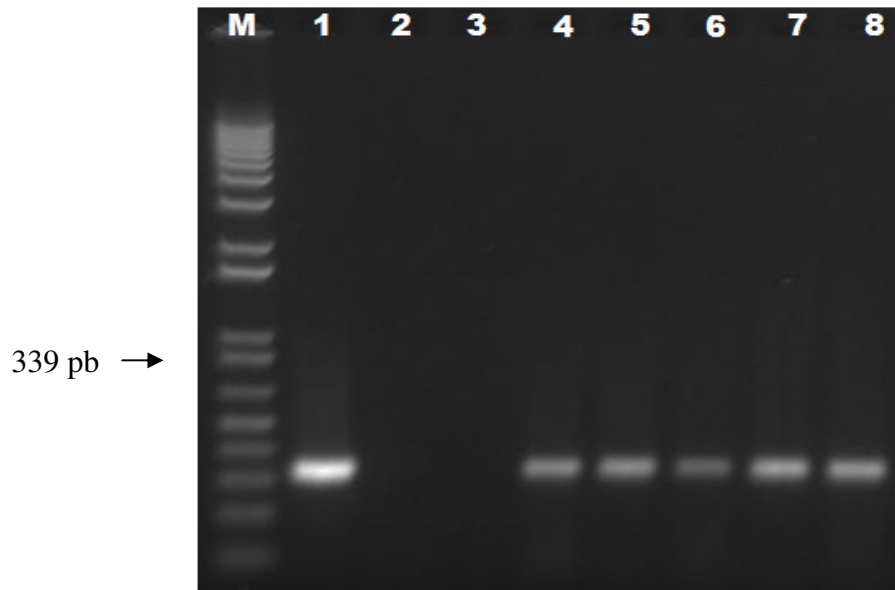


Figura 1. Gel de agarose 1% mostrando o resultado da RT-PCR para a confirmação de aquisição do CiLV-C por *B. phoenicis*. M = Marcador 100 bp NORGEN; 1-controle positivo 1; 2-controle negativo 2; 3-branco 3; 4-amostra 1; 5-amostra 2; 6-amostra 3; 7-amostra 4; 8-amostra 5.

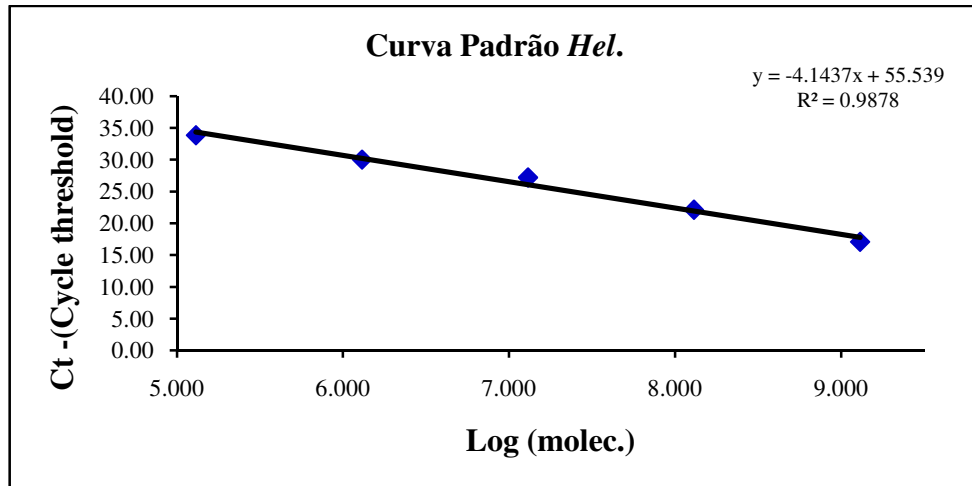


Figura 2. Curva padrão mostrando as relações lineares existentes entre as concentrações do CiLV-C e o *Ct*. O gráfico foi obtido pela plotagem entre os valores de *Ct* versus a concentração do RNA viral (cópias/reação) gerado a partir das médias de três replicatas técnicas.

Tabela 1. qPCR pelo sistema TaqMan[®] para detecção do CiLV-C no vetor em todos os tratamentos e tempos em estudo, avaliados com base no número de ciclos no qual o sinal fluorescente associado a um acúmulo de amplicon cruza o threshold (*Ct*).

Hospedeiros	Tempos					
	0 (D.A.I.) ^a			21 (D.A.I.)		
	<i>Ct</i> ±D.P. ^b	C.V.(%) ^c	Nº de cópias ^d	<i>Ct</i> ±D.P. ^b	C.V.(%) ^c	Nº de cópias ^d
PFP ^e -1 ^f	26,88±0,36	1,37	8,26E+06 b A	32,83±1,44	4,39	3,03 E+05 bB
PFP-2 ^g	26,70±0,08	0,31	9,13 E+06b A	32,97±0,57	1,73	2,80 E+05 bB
PFP3 ^h	26,54±0,10	0,37	9,96 E+06b A	32,73±0,92	2,81	3,20 E+06 bB
FLPS ⁱ -1	25,52±0,02	0,07	1,76 E+07 aA	27,52±0,08	0,28	5,78 E+06 aB
FLPS -2	25,52±0,02	0,07	1,76 E+07 aA	28,13±0,05	0,19	4,12 E+06 aB
FLPS -3	25,56±0,08	0,30	1,72 E+07 aA	27,87±0,31	1,10	4,75 E+06 aB
FLPA ^j -1	29,31±0,30	1,04	2,14 E+06 cA	33,29±0,28	0,82	2,34 E+05 cB
FLPA -2	29,07±0,40	1,38	2,44 E+06 cA	34,26±0,24	0,71	1,36 E+05 cB
FLPA -3	29,23±0,35	1,21	2,23 E+06 cA	33,36±0,29	0,86	2,25 E+05 cB

^adias após a infestação (transferência dos ácaros para os tratamentos); médias do *Cycle threshold* (*Ct*) e desvio padrão (D.P.) obtidos em triplicatas; ^ccoeficiente de variação (C.V.); ^dnúmero de cópias do RNA viral/ μ L obtido por amostra em cada tratamento; ^eplanta de feijão-de-porco; ^{f,g,h}repetições – 1, 2 e 3, respectivamente; ⁱfruto de laranja Pêra sintomático; ^jfruto de laranja Pêra assintomático (sadio).

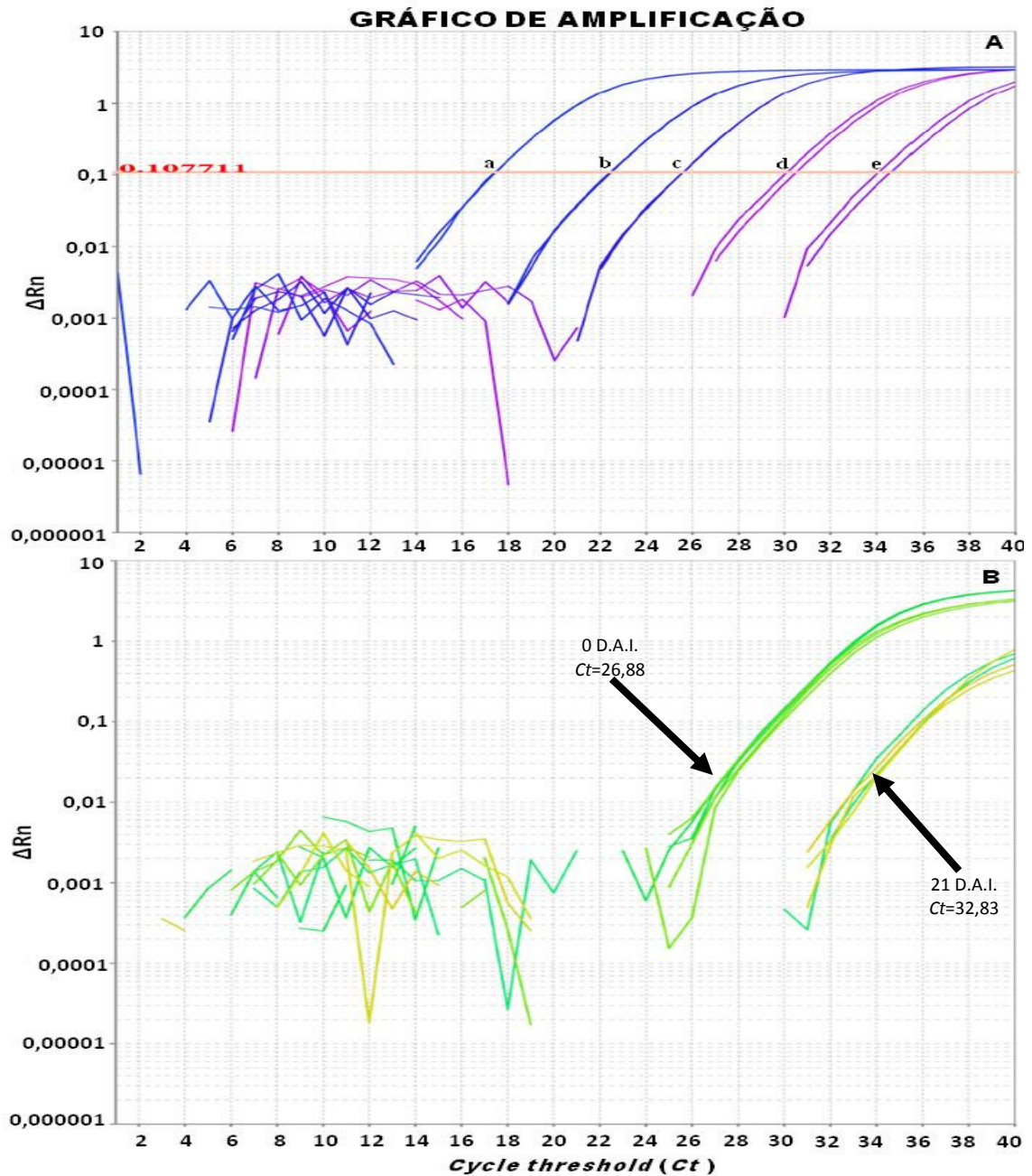


Figura 3. (A) Cinética da amplificação da curva padrão gerada nas seis diluições seriais ($a=1,91 \times 10^9$; $b=1,15 \times 10^8$; $c=1,43 \times 10^6$; $d=1,71 \times 10^5$; $f=1,3 \times 10^1$). As reações foram realizadas em triplicatas de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Hel* do CiLV-C. (B) *amplicons* da sequência alvo do CiLV-C expressos pelo putativo gene da *Hel* em *B. phoenicis* no tratamento planta de feijão-de-porco por qPCR nos tempos 0 e 21 D.A.I. (dias após a infestação).

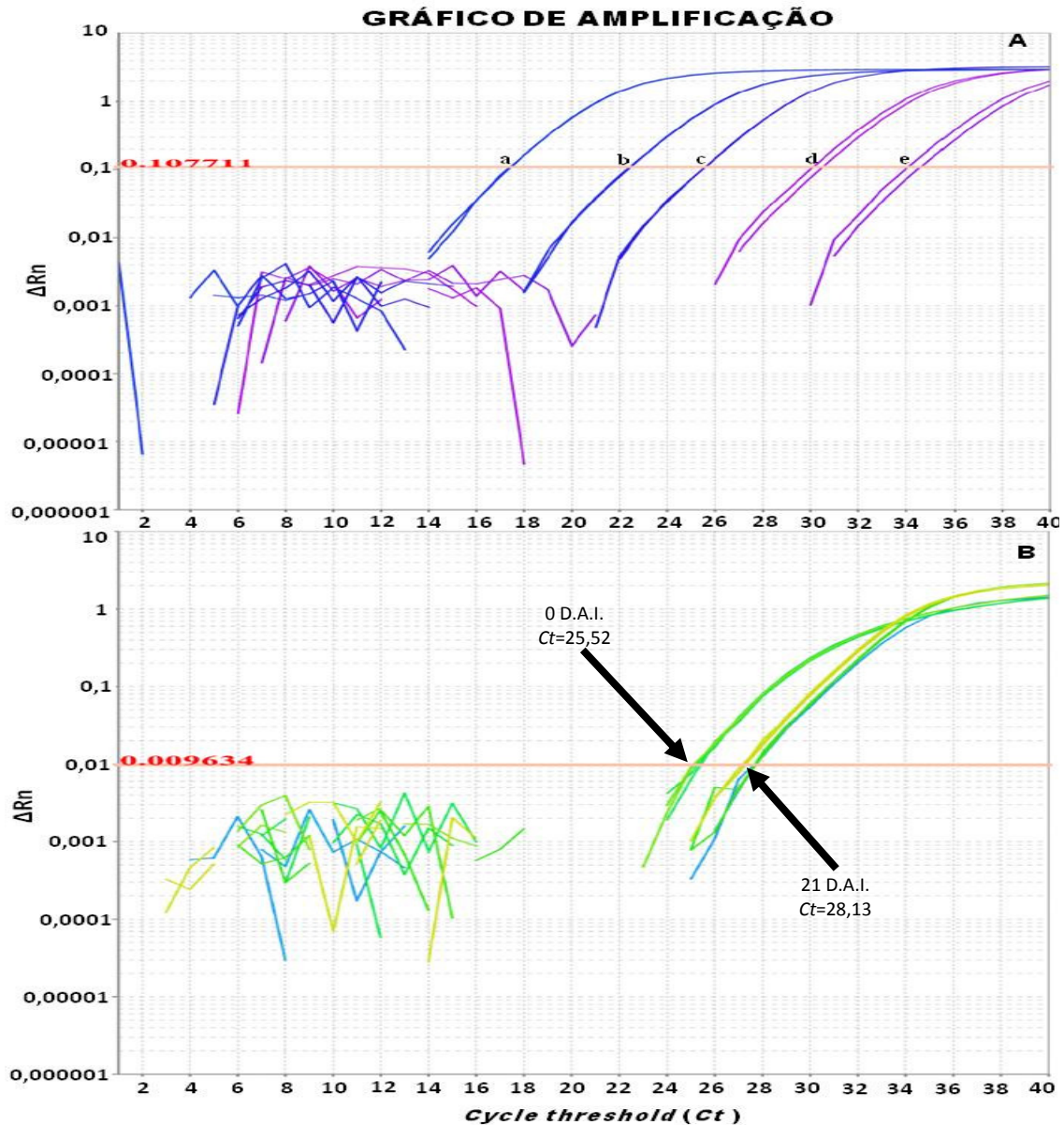


Figura 4. (A) Cinética da amplificação da curva padrão gerada nas seis diluições seriais ($a=1,91 \times 10^9$; $b=1,15 \times 10^8$; $c=1,43 \times 10^6$; $e=1,71 \times 10^5$; $f=1,3 \times 10^1$). As reações foram realizadas em triplicatas de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Hel* do CiLV-C. (B) *amplicons* da sequência alvo do CiLV-C expressos pelo putativo gene da *Hel* em *B. phoenicis* no tratamento fruto de laranja Pêra sintomático por qPCR nos tempos 0 e 21 D.A.I. (dias após a infestação).

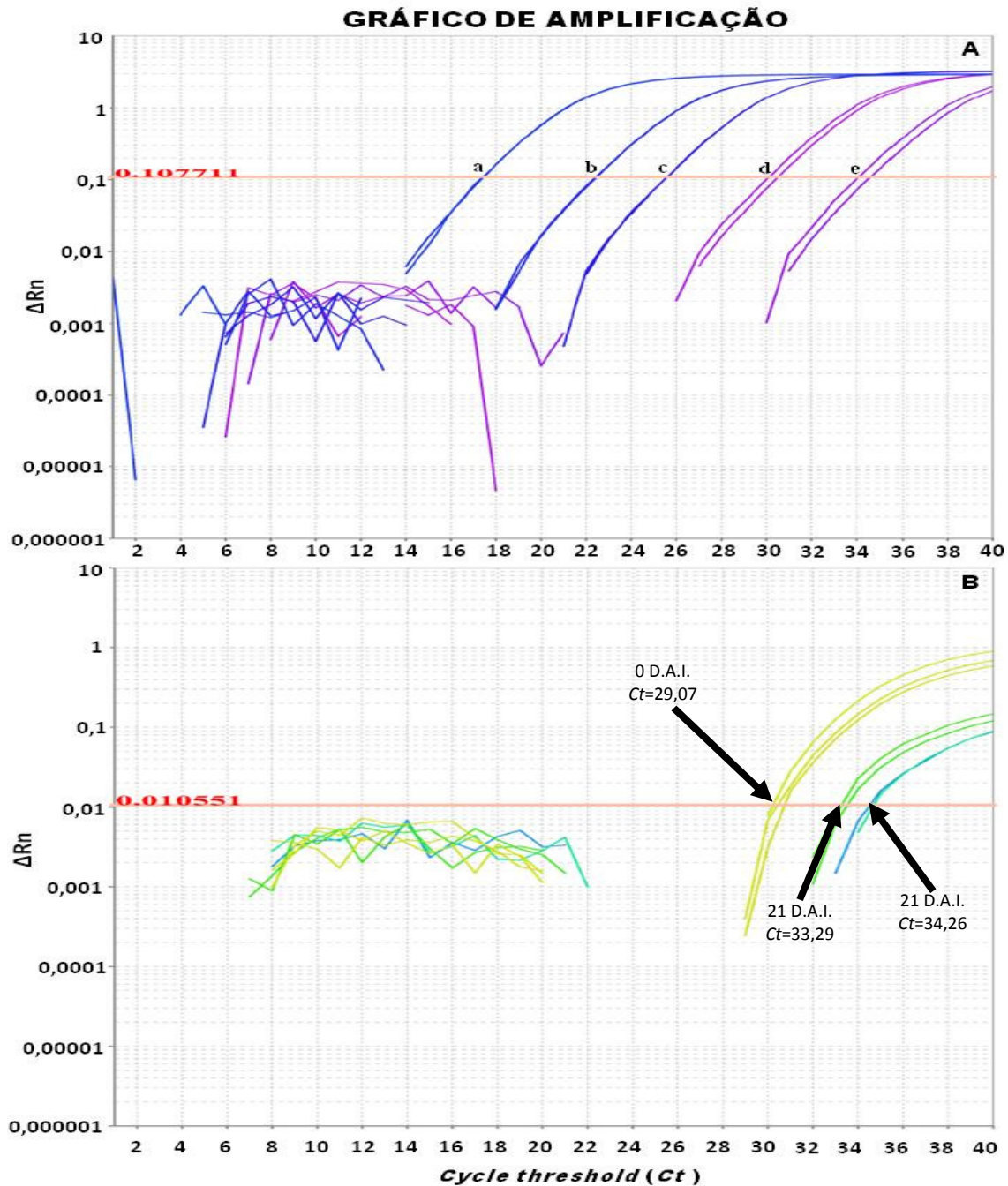


Figura 5. (A) Cinética da amplificação da curva padrão gerada nas seis diluições seriais ($a=1,91 \times 10^9$; $b=1,15 \times 10^8$; $c=1,43 \times 10^6$; $e=1,71 \times 10^5$; $f=1,3 \times 10^1$). As reações foram realizadas em triplicatas de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Hel* do CiLV-C. (B) *amplicons* da sequência alvo do CiLV-C expressos pelo putativo gene da *Hel* em *B. phoenicis* no tratamento fruto de laranja Pêra sadio por qPCR nos tempos 0 e 21 D.A.I. (dias após a infestação).

Tabela 2. Eficiência de transmissão do CiLV-C por *B. phoenicis* nos tratamentos estudados e diferentes tempos de coleta (1; 2; 3 e 4), avaliados por um período de até 120 dias, quanto à presença ou ausência de sintomas da leprose.

Tratamentos	Sintomas				Tratamentos	Sintomas				Tratamentos	Sintomas			
	30	60	90	120		30	60	90	120		30	60	90	120
	D.A.I. ^a	D.A.I.	D.A.I.	D.A.I.		D.A.I.	D.A.I.	D.A.I.	D.A.I.		D.A.I.	D.A.I.	D.A.I.	D.A.I.
PFP ^b -T1 ^c	- ^g	-	-	-	FLPS ⁱ -T1	+	+	+	+	FLPA ^j -T1	-	+	+	+
PFP-T1	-	-	-	+	FLPS-T1	-	-	-	+	FLPA-T1	-	+	+	+
PFP-T1	+ ^h	+	+	+	FLPS-T1	-	+	+	+	FLPA-T1	-	-	-	-
PFP-T2 ^d	-	+	+	+	FLPS-T2	-	-	-	-	FLPA-T2	-	+	+	+
PFP-T2	-	+	+	+	FLPS-T2	-	+	+	+	FLPA-T2	-	-	+	+
PFP-T2	-	-	+	+	FLPS-T2	-	-	-	-	FLPA-T2	-	-	-	-
PFP-T3 ^e	-	-	-	+	FLPS-T3	-	+	+	+	FLPA-T3	-	+	+	+
PFP-T3	-	-	-	-	FLPS-T3	-	+	+	+	FLPA-T3	-	-	+	+
PFP-T3	-	+	+	+	FLPS-T3	-	+	+	+	FLPA-T3	-	+	+	+
PFP-T4 ^f	-	-	-	+	FLPS-T4	-	-	+	+	FLPA-T4	-	-	-	-
PFP-T4	-	-	-	-	FLPS-T4	-	+	+	+	FLPA-T4	-	-	-	-
PFP-T4	-	+	+	+	FLPS-T4	-	+	+	+	FLPA-T4	-	-	-	-

^a30, 60, 90, 120 ±5 dias após a infestação das plantas com ácaros virulíferos para os testes de transmissão; ^bplanta de-feijão-de-porco; ^cTempo 1 (momento de transferência dos ácaros para PFP, FLPS E FLPA); ^dTempo 2 (7 dias após a transferência dos ácaros para PFP, FLPS E FLPA); ^eTempo 3 (14 dias após a transferência dos ácaros para PFP, FLPS E FLPA); ^fTempo 4 (21 dias após a transferência dos ácaros para PFP, FLPS E FLPA); ^gausência de sintomas; ^hpresença de sintomas; ⁱfruto de laranja Pêra sintomático; ^jfruto de laranja Pêra assintomático (sadio).

Capítulo III

Interação do vírus da mancha anular do cafeeiro com *Brevipalpus phoenicis*

(Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)

1 **Interação do vírus da mancha anular do cafeeiro com *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)**
2 **(Acari: Tenuipalpidae)**

3

4 Frank Magno da Costa^{1,2}, Marinês Bastianel², Juliana Freitas-Astúa^{2,3}, Elliot W. Kitajima⁴;
5 Karen S. Kubo^{2,5}, Marcos A. Machado² & Manoel Guedes Corrêa Gondin Júnior.¹

6

7 ¹Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de
8 Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil, ²Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’, Instituto
9 Agrônômico de Campinas, 13490-970, Cordeirópolis, SP, Brasil, ³Centro Nacional de
10 Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 44380-
11 000, Cruz das Almas, BA, Brasil, ⁴Núcleo de apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica,
12 Escola Superior de agricultura ‘Luiz de Queiroz’. 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil, ⁵Instituto
13 de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

14 Autor para Correspondência: Frank M. Costa, e-mail: fmcosta1@yahoo.com.br

15

16 **RESUMO**

17

18 Coffee ringspot virus (CoRSV) é o agente etiológico da mancha anular do cafeeiro
19 (MAC) que tem como vetor o ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). As interações vírus-
20 vetor são extremamente complexas e os mecanismos envolvidos entre CoRSV e *B. phoenicis*
21 têm sido parcialmente elucidadas. O objetivo deste trabalho foi investigar o tipo de interação
22 estabelecida neste patossistema. Ácaros avirulíferos foram submetidos a um período de acesso
23 para aquisição do vírus de cinco dias em folhas de cafeeiro com sintomas da mancha anular.
24 Após esse tempo foram transferidos para os tratamentos: feijão-de-porco (não hospedeira do
25 vírus), café sintomático e café sadio, e coletados em quatro tempos: 0; 7; 14 e 21 dias após o
26 confinamento. As interações foram investigadas pela reação em cadeia da polimerase
27 quantitativa em tempo real (qPCR), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e testes de
28 transmissão. A qPCR revelou a presença de vírus nos ácaros, contudo não houve aumento da
29 carga viral ao longo do tempo em nenhum dos tratamentos avaliados. A MET não detectou
30 partículas de CoRSV no interior dos ácaros. Não houve produção de sintomas da MAC depois
31 do teste de transmissão, nenhum dos tratamentos, após seis meses de avaliação. Os resultados
32 indicam haver a necessidade de um longo período de latência do para transmissão do CoRSV
33 por *B. phoenicis*.

34 **Palavras-chave:** qPCR, transmissão, CoRSV, vírus-vetor.

35 **ABSTRACT**

36

37 **Interaction between Coffee ringspot virus and *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari:**
38 **Tenuipalpidae)**

39

40 Coffee ringspot virus (CoRSV) is the causal agent of the coffee ringspot disease
41 (CRSD) have that vector the mite *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). The interactions virus-
42 vector are complex and the mechanisms involved between CoRSV e *B. phoenicis* has been
43 partially elucidated. The aim of this study was to investigate the type of interaction
44 established in this pathosystem. Non-viruliferous mites were submitted to acquisition access
45 period (AAP) of virus during five days in leaves coffee with symptoms of ring spot disease.
46 After that, they were transferred to the treatments mungbean plants (non-host of the virus),
47 symptomatic coffee plants and asymptomatic coffee plants, and collected in four different
48 times: 0; 7; 14 and 21 days after infestation. Interactions were assessed by real time
49 quantitative polymerase chain reaction (qPCR), transmission electron microscopy (TEM) and
50 transmission assays. The qPCR revealed presence of virus in the mites, however no increase
51 in viral titer over time in all treatments evaluated. The TEM was not possible to detect
52 CoRSV particles in tissue of mites. No symptoms of CRSD were observed after six months of
53 evaluation. These results suggest that a long incubation (latent) period may be necessary for
54 transmission of CoRSV by *B. phoenicis*.

55

56 **Keywords:** qPCR, transmission, CoRSV, virus-vector.

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

INTRODUÇÃO

A transmissão de fitovírus por ácaros do gênero *Brevipalpus* é conhecida há décadas (KNORR, 1950). A mancha anular do cafeeiro (MAC), causada por Coffee ringspot virus (CoRSV) é transmitida por *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae).

Os sintomas da MAC são expressos de maneira localizada em folhas, frutos e, menos frequentemente, em ramos. Nas folhas, as lesões se iniciam como manchas cloróticas, pequenas e circunscritas em forma de anel ou algumas vezes irregulares, porém aumentam de tamanho com a evolução da doença. Podem coalescer atingindo toda a área foliar, expandindo-se em alguns casos ao longo das nervuras (CHAGAS et al., 2003).

As partículas do CoRSV apresentam-se na forma de bastonete curto, com de 30-40 nm x 100-110 nm de dimensão. Análises de folhas sintomáticas, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiram observar partículas virais apenas na área em torno da lesão e ainda a presença de inclusões elétron-transparentes conhecidas como viroplasmas (local onde ocorre a montagem e/ou replicação do vírus) no núcleo de células infectadas (CHAGAS et al., 2003). Essa característica é comum aos VTB-N, ou VTB do tipo nuclear, geralmente associado à membrana do invólucro nuclear. A localização celular e os efeitos citopáticos diferenciam os VTB-N dos VTB-C (citoplasmáticos), os quais se localizam no lúmen do retículo endoplasmático (KITAJIMA et al., 2003, 2010; KONDO et al., 2003).

O entendimento do processo de transmissão requer considerações detalhadas, que envolvem os aspectos de aquisição, relações vírus-vetor, inoculação e desenvolvimento da doença. Técnicas de imunocitoquímica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e qPCR são ferramentas poderosas para o entendimento das interações existentes entre os vírus e seus vetores (BERTOLINI et al., 2008, ULLMAN et al., 2003).

Análises de MET revelaram a presença de viroplasmas tanto no núcleo quanto no citoplasma de células das glândulas prossomais de *B. phoenicis* procedentes de cafeeiros infectados por CoRSV. Estas análises sugerem que o vírus replica-se nos tecidos do ácaro, o que caracterizaria uma relação vírus-vetor do tipo circulativa propagativa (KITAJIMA et al., 2007).

A quantificação de patógenos através da técnica de qPCR tem sido amplamente utilizada e diferentes metodologias tem sido empregadas no estudo de vírus persistente (CLEMENTI et al., 1993). A quantificação deve ser realizada nas situações em que se faz necessário determinar o número absoluto de cópias da sequência alvo. Na literatura é possível encontrar diversos estudos onde se faz a quantificação absoluta de patógenos no

101 interior do vetor, com a técnica de qPCR (BERTOLINI et al., 2008, SAPONARI et al.,
102 2008). O sucesso do uso de qPCR com sondas marcadas pelo sistema TaqMan[®] tem sido
103 relatado para a detecção de vírus em vetores (OLMOS et al., 2005).

104 Neste trabalho foi estudado o tipo de interação estabelecida entre o CoRSV e *B.*
105 *phoenicis*. As seguintes hipóteses foram testadas: (I) verificar se ocorre aumento do número
106 de cópias do CoRSV no interior do ácaro ao longo do tempo por qPCR; (II) determinar se a
107 transmissão do CoRSV por *B. phoenicis* é do tipo persistente circulativa propagativa.

108

109

MATERIAL E MÉTODOS

110

111 Frutos de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] var. Pêra no estágio de
112 desenvolvimento conhecido como “bola de tênis” foram coletados no pomar do Centro APTA
113 Citros ‘Sylvio Moreira’ (CAPTACSM) (22°32S, 47°27O) em uma área sem histórico de
114 ocorrência da leprose. Depois de colhidos os frutos foram transportados para o laboratório de
115 Acarologia, lavados em água corrente, com o auxílio de uma esponja para retirada de
116 resíduos, ovos e formas ativas de artrópodes vindos do campo, e finalmente expostos ao ar
117 para secagem. Em seguida, foram imersos até 1/3 de sua área em parafina na forma líquida,
118 mantida à temperatura de aproximadamente 50°C. Após a secagem, no limite entre a área
119 tratada e não tratada parafina foi colocada cola entomológica Tanglefoot com a finalidade de
120 evitar o escape dos ácaros (CHIAVEGATO, 1986). A superfície do fruto não tratada com a
121 parafina recebeu uma mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina na proporção de 1:1:2,
122 umedecida em água, cuja finalidade foi servir como substrato para oviposição (RODRIGUES
123 et al., 2007). A criação foi estabelecida a partir de uma população de *B. phoenicis* no
124 laboratório de Acarologia do CAPTACSM. A confirmação de que os ácaros eram avirulíferos
125 foi realizada por RT-PCR usando primers específicos para CoRSV (LOCALI et al., 2005). Os
126 ácaros avirulíferos foram transferidos para os frutos com o auxílio de um pincel de poucos
127 pêlos e mantidos em uma sala a 25±1°C, umidade relativa do ar de 60±5% de e 10 h de
128 fotofase.

129

130 **Aquisição do vírus pelo vetor**

131

132 Folhas de cafeeiro variedade Mundo Novo com sintomas provocados pelo CoRSV
133 foram coletadas de plantas mantidas em casa-de-vegetação do CAPTACSM para servir como

134 fonte de inóculo. Estas folhas foram lavadas em água corrente para retirada de resíduo e
135 ácaros existentes e depois eram expostas ao ar para secagem. Após esse processo, placas de
136 Petri foram forradas com algodão embebido em água para o acondicionamento das folhas, que
137 após a secagem foram isoladas com uma camada de algodão no entorno do limbo foliar,
138 formando uma arena para evitar o escape dos ácaros e manter a umidade. Após o preparo das
139 folhas, cerca de 5.000 fêmeas adultas avirulíferas de *B. phoenicis* foram transferidas para as
140 folhas sintomáticas e submetidas a um período de acesso à aquisição (PAA) do vírus de cinco
141 dias. Após este período, dez ácaros foram coletados de cada folha e transferidos para
142 microtubos de centrífuga de 1,5 mL, para posterior extração do ácido ribonucléico (RNA),
143 síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase, a fim de confirmar que estes haviam
144 realmente adquirido o vírus.

145 Após o PAA e confirmada à aquisição do vírus pelo vetor, um total de 1.500 fêmeas
146 adultas virulíferas foram transferidas para cada hospedeiro (feijão-de-porco, cafeeiro
147 sintomático e cafeeiro sadio). Os três hospedeiros foram periodicamente inspecionados para o
148 acompanhamento da oviposição e retirada dos ovos, com a finalidade de evitar que ácaros de
149 gerações subsequentes fossem coletados. Após a transferência dos ácaros para feijão-de-
150 porco, cafeeiro sintomático e cafeeiro sadio ou assintomático, estes foram mantidos na sala de
151 criação do laboratório de Acarologia com a mesma temperatura, umidade relativa e fotofase
152 mencionadas no item anterior.

153

154 **Aspectos biológicos da interação CoRSV-C / *B. phoenicis***

155

156 Para o teste de transmissão do CoRSV por *B. phoenicis*, cinco amostras de 10 fêmeas
157 adultas, submetidas à aquisição do vírus, foram coletadas de cada tratamento. Os ácaros foram
158 transferidos para plantas teste de café, variedade ‘Mundo Novo’ com a finalidade de verificar
159 a eficiência de transmissão do CoRSV por *B. phoenicis*. Um total de 600 ácaros supostamente
160 virulíferos foi transferido para as plantas. Utilizaram-se cinco repetições, sendo que cada
161 repetição foi constituída por uma planta. Cada planta foi infestada com 10 ácaros virulíferos.
162 As folhas das plantas teste foram previamente preparadas com uma mistura de farinha, areia
163 fina e gesso umedecida, como substrato para oviposição (RODRIGUES et al., 2007). Depois
164 de infestadas por ácaros virulíferos, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e
165 semanalmente inspecionadas quanto à presença dos sintomas da mancha anular, por um
166 período de seis meses.

167

168 **Detecção do CiLV-C por microscopia eletrônica de transmissão – MET**

169

170 Amostras de ácaros adultos virulíferos usados nos experimentos foram enviados ao
171 Núcleo de apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica de Transmissão - NAP/MEPA da
172 Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ – ESALQ, para serem analisados por MET.
173 Os ácaros foram mergulhados em uma solução com 3% de glutaraldeído em tampão
174 cacodilato 0,1 M, pH 7,2, contendo 1,8% de sacarose. Para facilitar a penetração dos
175 reagentes, a extremidade terminal do opistosoma foi seccionado sob lupa estereoscópica.
176 Após um mínimo de 1 h de fixação, os ácaros foram lavados na solução do tampão carreador
177 e pós-fixados em uma solução de OsO₄ 1% no mesmo tampão por 1 hora. Seguiu-se uma
178 desidratação em solução crescente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90%), 10 min cada
179 e três vezes em solução a 100%. As amostras foram infiltradas em uma solução acetona/resina
180 epóxica Spurr (1:1) por 5-6 horas e na resina pura por uma noite. Os ácaros foram emblocados
181 em formas de silicone e a resina foi polimerizada por 2 dias. Os blocos foram seccionados em
182 um ultramicrotomo Leica UC6 equipado com navalha de diamante e as secções coletadas em
183 retículos de cobre de 3 mm de diâmetro, e 100 mesh de malha, coberta com filme de
184 Formvar. As secções foram contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo de
185 Reynold.

186

187 **Desenho, síntese e validação dos *primers* e sondas**

188

189 Utilizando o *software* Primer-Express[®] (Applied Biosystems) foram desenhados quatro
190 pares de primers e dois pares de sondas, a partir de sequências do genoma do CoRSV (Eliane
191 Cristina Locali-Fabris, *dados não publicados*) correspondentes a uma região do gene que
192 codifica a Replicase (gene *Rep*). Depois de testados, apenas um par de *primers* e uma sonda
193 foram utilizados para qPCR. As sequências dos *primers* e sondas são descritas a seguir: *Rep.-*
194 *3-R* (5'-TTCAACCATTGGTGCCTTC-3'); *Rep.-3-F* (5'-ACCCCTTCTCCAAATCAACC-
195 3'), gerando um amplicon de 121 pb. A sonda (5'-TGCAGGATTCTCGAAGGGCTCA-3')
196 foi marcada com os fluoróforos FAM e IOWA BALCK FQ (repórter e quencher),
197 respectivamente. Todos foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies). A
198 validação dos *primers* e sonda foi realizadas variando as concentração de *primers*, sonda e
199 cDNA. Os testes realizados foram: concentração de *primers* e sonda (5 e 10 µM); cDNA (1:1,
200 1:10 e 1:100), quantidades de *primers* e sonda: 0,5 µL, 0,8 µL e 1,0 µL).

201

202 **Isolamento do RNA total e síntese de cDNA**

203

204 Para o isolamento do RNA total do CoRSV contido no vetor, cinco amostras de 10
205 fêmeas adultas virulíferas, foram coletadas ao acaso em cada tratamento (hospedeiro x
206 tempo), totalizando 600 ácaros analisados ao final do experimento. Os ácaros foram
207 transferidos para microtubos de centrífuga de 1,5 mL e armazenadas em freezer a -80°C. O
208 isolamento do RNA total de cada amostra foi extraído utilizando o RNeasy Plus Micro Kit®
209 (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após o isolamento, o RNA foi ressuspendido
210 em 20µL de água livre de RNase, em seguida quantificados em Espectrofotômetro do tipo
211 Nanodrop ND 8000 (Thermo Scientific) e, armazenados em freezer à -80°C.

212 O cDNA foi sintetizado a partir de 20 ng da fita molde do RNA do CoRSV para cada
213 amostra do item anterior, utilizando o First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) seguindo
214 as recomendações do fabricante em duas etapas: etapa 1 – em um tubo de microcentrífuga
215 com capacidade para 0,5 mL adicionou-se 11,5 µL de RNA + água tratada com DEPC
216 (Dietilpirocarbonato), 1 µL de random hexamer primer (Fermentas). Após a adição dos
217 reagentes as amostras foram submetidas à temperatura de 70°C por 5 minutos. Decorrido esse
218 tempo as amostras foram então colocadas imediatamente no gelo para proceder a segunda
219 etapa, que consistiu da adição de 4 µL do tampão de reação da Revertaid (5x), 0,5 µL da
220 ribolock™ RNase inhibitor (Fermentas), 2 µL de dNTP (2,5 mM) e 1 µL da Revertaid™ H
221 minus reverse transcriptase (Fermentas). O volume total da reação foi de 20µL. A reação foi
222 incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Ao término da reação, as amostras foram
223 armazenadas em freezer a -80 °C.

224

225 **Construção da curva-padrão para o CoRSV**

226

227 Para a obtenção da curva-padrão com uma região do gene *Rep*, foram utilizadas
228 soluções de plasmídeo, contendo o respectivo inserto. O RNA viral foi amplificado através da
229 transcrição reversa e PCR convencional, utilizando *primers* externos. Em seguida o produto
230 da PCR foi clonado por meio de ligação a um plasmídeo contendo promotor T7 e replicado
231 em células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Posteriormente, foram selecionadas cerca
232 de 5 a 10 colônias que apresentavam o plasmídeo recombinante e o cDNA isolado por meio
233 de miniprep. O passo seguinte foi identificar as colônias que apresentavam o inserto
234 (segmento alvo). Este foi realizado por meio da observação do crescimento bacteriano, uma

235 vez que se usou o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). A equação de regressão para o
 236 gene estudado (*Rep*) foi calculada com o auxílio do programa Microsoft Office Excell®, 2007.

237 A concentração do DNA plasmidial foi determinada através de espectrofotômetro
 238 Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific). Os parâmetros utilizados para converter a
 239 concentração obtida em ng/uL para número de moléculas/uL foram os seguintes: PM médio
 240 de 1 kb de ssRNA = 330 g/mol; 1 mol = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas. O DNA foi submetido a
 241 diluições seriadas de uma solução estoque do plasmídeo contendo o inserto do gene. O fator
 242 de diluição foi de [1:10], e as diluições são descritas a seguir: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000,
 243 1:10.000, 1:100.000, 1:1000.000; 1:10.000.000; 1:100.000.000; 1:1.000.000.000.

244 A curva-padrão foi obtida por meio de quantificação absoluta, utilizando o 7500 Fast
 245 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata em
 246 um volume de 20 µL, contendo 2 µL da solução do plasmídeo, 0,8 µL do *primer Rep-3-F* (10
 247 µM), 0,8 µL do *primer Rep-3-R* (10 µM), 0,8 µL da sonda *CoRSV-I* (10 µM), 5,6 µL de água
 248 Milli-Q filtrada e autoclavada e 10 µL do TaqMan® Fast Universal PCR MasterMix (2X)
 249 (Applied Biosystems). As condições térmicas de ciclagem da curva-padrão foram: 95°C por
 250 20 segundos, 95°C por 03 segundos e 40 ciclos de 15 segundos e 60°C por 30 segundos a cada
 251 ciclo, num total de 40 ciclos, tendo duração de aproximadamente 45 minutos. A curva padrão
 252 foi gerada pela amplificação de cada diluição. A faixa linear de abrangência da curva padrão
 253 foi de seis ordens de magnitude e a eficiência da amplificação foi calculada pela seguinte
 254 fórmula: $(E = 10^{(-1 / slope) - 1}) \times 100$. O número inicial de moléculas/mL da solução estoque e
 255 a conversão para número de transcrito foi determinado de acordo com Bertolini et al. (2008).

256

257 **Ensaio quantitativo da reação em cadeia da polimerase – qPCR**

258

259 A detecção e quantificação do número de partículas do CoRSV foram realizadas em
 260 todas as amostras de cDNA sintetizado em um volume final da reação de 20 µL. A reação
 261 continha 2 µL do cDNA alvo, 0,8 µL do *primer Rep-3-F* (10 µM), 0,8 µL do *primer Rep-3-R*
 262 (10 µM), 0,8 µL da sonda *CoRSV-I* (10 µM), 5,6 µL de água Milli-Q filtrada e autoclavada e
 263 10 µL do TaqMan® Fast Universal PCR MasterMix (2X) (Applied Biosystems). As reações
 264 foram executadas utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied
 265 Biosystems). Para cada amostra foram realizadas reações em triplicatas. Os controles
 266 utilizados foram constituídos por: (i) controle positivo – cDNA proveniente de ácaros
 267 virulíferos; (ii) controle negativo - cDNA proveniente de ácaro avirulíferos e (iii) branco -
 268 água Milli-Q filtrada e autoclavada, substituindo o cDNA. As condições térmicas de ciclagem

269 foram as mesmas utilizadas na construção das curvas-padrão citadas no item anterior. O gene
270 18S foi utilizado como controle endógeno visando normalizar as amostras das possíveis
271 diferenças de concentrações de cDNA.

272 A detecção do CoRSV no interior de *B. phoenicis* foi realizada para todos os
273 tratamentos (hospedeiros e tempos) através da análise do parâmetro “*Cycle threshold*” (*Ct*). O
274 *Ct* é definido como o número do ciclo na qual o início da amplificação gerada pela
275 fluorescência, entra na fase logarítmica, cruzando a linha threshold. Os valores de *Ct* podem
276 ser usados diretamente (método *Ct* comparativo) ou indiretamente (interpolação das curvas
277 padrões para criar valores lineares) para as análises quantitativas (APPLIED BIOSYSTEMS).

278

279 **Análise dos dados**

280

281 A plotagem da intensidade de fluorescência versus o número de ciclos foi realizada
282 automaticamente pelo *software* que fornece o valor do *Ct*. A média do *Ct* e do desvio padrão
283 (S.D.) para cada amostra foi calculado a partir dos valores dos C_{ts} das triplicatas. O
284 coeficiente de variação (C.V.%) dentro e entre amostras foi calculado como a porcentagem do
285 (S.D.%) em comparação com o valor médio do *Ct*.

286 A estatística foi realizada por meio da análise de variância pelo programa estatístico Assistat
287 Versão 7.6 beta, desenvolvido por Silva; Azevedo (2002).

288

289 **RESULTADOS**

290

291 Em todas as amostras analisadas foi constatado a presença de CoRSV nos ácaros
292 através do método de RT-PCR (Figura 1). Em todos os tratamentos estudados no qPCR,
293 observou-se um perfil de amplificação dos transcritos de CoRSV, com tamanho de amplicon
294 de 121pb. No entanto, partículas não puderam ser observadas por MET.

295 As fêmeas adultas de *B. phoenicis*, provenientes dos tratamentos (feijão-de-porco,
296 cafeeiro sintomático e cafeeiro sadio), dos diferentes tempos (0, 7, 14 e 21) não transmitiram
297 o CoRSV para as plantas infestadas. Também não houve expressão de sintomas típicos de
298 mancha anular nas plantas de café submetidas à infestação pelos ácaros virulíferos, durante o
299 tempo em que durou a avaliação.

300 O exame dos ácaros ao MET não permitiram detectar os efeitos citopáticos
301 característicos dos VTB-N (viroplasma nuclear e partículas em forma de bastonetes no núcleo
302 e citoplasma).

303 O conjunto de *primers* e sonda reconheceu a região do gene *Rep* de CoRSV. As
304 melhores concentrações foram: primer e sonda 10 μ M, na quantidade de 0,8 μ L. Quanto ao
305 cDNA a melhor concentração foi 1:1.

306 Foi observada a existência de uma forte relação linear entre as diluições ($R^2=0,997$).
307 Essa linearidade é em parte sustentada pela alta eficiência de amplificação (103%). O valor de
308 inclinação da curva (slope) obtido neste trabalho foi de -3.2695 (Figura 2).

309 A quantificação da sequência alvo foi realizada a partir de uma concentração inicial de
310 414 ng/ μ L do DNA. A linearização dessa quantificação forneceu um valor de cerca de 10^9
311 cópias/ μ L do inserto do gene *Rep* do CoRSV. A faixa de abrangência da curva padrão teve
312 uma ordem de seis magnitudes expressas em escala logarítmica da concentração, cujos
313 números de partículas virais estimadas foram: $6,74 \times 10^9$; $1,39 \times 10^8$; $1,29 \times 10^6$; $8,85 \times 10^3$;
314 $1,72 \times 10^2$; $3,27 \times 10$ (Figura 3).

315 A confiabilidade da técnica e também desta reação pôde ser medida pela dinâmica das
316 médias dos valores de *Ct* da curva padrão, observada nas triplicatas de cada amostra, cujos
317 valores foram 4,79; 10,30; 16,95; 24,02; 29,61 e 35,24 (Figura 2). O coeficiente de variação
318 para cada valor médio de *Ct* de 2,29; 2,35; 2,32; 0,50; 1,12 e 1,49%, respectivamente.

319 A estimativa da quantidade de sequências alvo do CoRSV foi realizada com base no
320 número de cópias do CoRSV (Tabela 1). Não houve diferença estatística significativa na
321 quantidade de cópias da sequência alvo do CoRSV no tratamento planta de feijão de porco e
322 cafeeiro sintomático ao longo dos diferentes tempos após a infestação (DAI). No tratamento
323 cafeeiro sadio parece ter havido perda de partículas do vírus, isto porque foi observado
324 diferença estatística entre os tempo 0 (1,71, 16,3 e 20,6) e 21 DAI (1,92, 2,55 e 1,57).

325 Os *Cts* médios do tratamento feijão-de-porco (tempo 1) variaram de 33,39 a 33,95 nas
326 três repetições avaliadas. Após 21 dias da transferência para os hospedeiros, os valores de *Ct*
327 obtidos variaram de 32,90 a 33,76 (Tabela 1, Figura 3B). No tratamento cafeeiro sintomático,
328 os resultados revelaram variação nos valores de *Cts* 30,67 e 31,22, no tempo 1. Aos 21 dias
329 após a transferência dos ácaros para o cafeeiro sintomático, os *Cts* médios variaram de 30,44 a
330 31,36 (Tabela 1, Figura 4B). Os valores médios de *Ct* para o tratamento cafeeiro sadio (Tabela
331 1, Figura 5B) variou de 29,81 a 30,15 no tempo 1 e de 33,86 a 35,73 aos 21 dias de
332 transferência dos ácaros para este tratamento. A diferença neste tratamento observada no
333 gráfico de amplificação em função do tempo foi da ordem de 4,33 *Cts*.

334 Em todos os tratamentos estudados (hospedeiro e tempo de coleta) foi detectado a
335 presença do CoRSV em *B. phoenicis*. O Teste de Tukey detectou diferença estatística entre os

336 tempos de coleta 1 e 4 no tratamento cafeeiro sadio, com médias dos valores de *Ct* de 30,02
337 (tempo 1) e 34,54 (tempo 4) (Tabela 2).

338 Quando se analisa apenas o tratamento feijão-de-porco, observa-se que não houve
339 diferença estatística entre os *amplicons* gerados nos tempos de coleta 1 e 4, com valores de *Ct*
340 33,75 e 33,32, respectivamente (Tabela 2). No tratamento cafeeiro sintomático não houve
341 diferença estatística entre os tempos de coleta, comparados pelos valores médios de *Ct*
342 (Tabela 2).

343 Analisando isoladamente o fator hospedeiro dentro do fator tempo, nota-se ainda que
344 no tempo 1 os tratamentos cafeeiro sadio e sintomático foram estatisticamente iguais entre si,
345 com valores médios de *Ct* de 30,02 (sadio) e 30,93 (sintomático). No entanto, estes diferiram
346 estatisticamente do tratamento feijão-de-porco, com *Ct* de 33,75. A precisão da análise de
347 variância foi medida pelo coeficiente de variação (C.V. = 1,67%) e pela diferença mínima
348 significativa (D.M.S.) de 0,95 para hospedeiros e 1,17 para tempos (Tabela 2).

349 Comparando-se hospedeiro dentro do fator tempo 21 dias (Tabela 2) nota-se diferença
350 estatística significativa entre os três hospedeiros. O hospedeiro cujo início da geração do
351 *amplicon* ocorreu primeiro foi o cafeeiro sintomático com *Ct* de 30,77. Este foi
352 estatisticamente diferente de feijão-de-porco e cafeeiro sadio, cujo início da amplificação
353 aconteceu nos *Cts* 33,32 e 34,54. No tratamento feijão-de-porco a amplificação iniciou antes
354 daquela observada no tratamento cafeeiro sadio ($p < 0,05$). A amplificação mais tardia foi
355 observada no tratamento cafeeiro avirulífero *Ct* 34,54.

356

357

DISCUSSÃO

358

359 O período de acesso para aquisição de cinco dias utilizado neste trabalho foi
360 suficientemente satisfatório, pois foi possível comprovar a presença do vírus no interior do
361 vetor tanto por PCR convencional, quanto por qPCR. No entanto, nas análises por MET, o
362 fato de não se ter observado partículas virais nos ácaros pode estar relacionado a três
363 prováveis causas: (i) por se tratar de uma técnica menos sensível que as que envolvem PCR,
364 (ii) por ocorrer uma baixa concentração viral no vetor.

365 Estudos de microscopia eletrônica de transmissão realizados por Kitajima et al.,
366 (2007) revelaram a presença de partículas de CoRSV e viroplasmas (sítio de replicação dos
367 vírus) no núcleo e no citoplasma de células das glândulas prosomais de ácaros provenientes
368 de plantas com sintomas da mancha anular. Mesmo encontrando viroplasmas no interior do
369 vetor, este é um evento raro, pois isto foi verificado em menos de 10% das amostras

370 analisadas (KITAJIMA et al., 2010). Estes viroplasmas encontrados por Kitajima et al.,
371 (2007) eram essencialmente similares aos observados nos tecidos das lesões causadas pelo
372 CoRSV nas folhas e frutos (CHAGAS et al., 2003), isto sugere que CoRSV deve se replicar
373 nos tecidos do ácaro. É importante destacar que tais ácaros foram coletados de plantas
374 localizadas em área com histórico de ocorrência da doença. Isto significa que os ácaros
375 tiveram livre acesso para o contato com lesões provocadas pelo vírus, possivelmente desde o
376 estágio larval até a fase adulta. Dessa forma, os ácaros tiveram tempo suficiente e necessário
377 para que o vírus estabeleça com sucesso uma íntima relação com o vetor, vencendo o período
378 de latência e provavelmente replicando-se no interior do mesmo.

379 Trabalhos envolvendo a quantificação de CoRSV em *B. phoenicis* praticamente
380 inexistem. Portanto, exemplos do que acontece com outros patossistemas são usados como
381 modelo na tentativa de elucidar ou compreender melhor o tipo de relação existente nesse
382 patossistema. Nicolini-Teixeira (2008) comparou a quantidade de CiLV-C e alguns VTB-N
383 tanto em *B. phoenicis* quanto na planta. A autora constatou diferenças em *Ct*s entre os títulos
384 de VTB-N (CICSV e CoRSV) e VTB-C (CiLV-C). Para o CoRSV o valor de *Ct* encontrado
385 em *B. phoenicis* e plantas foi de 24 e 23, respectivamente. No presente trabalho, o valor
386 médio para o CoRSV no ácaro ficou em torno do 30 *Ct*, uma diferença portanto, de 6 *Ct*s. Isto
387 pode estar relacionado ao fato de a autora ter analisado ácaros provenientes de plantas
388 infectadas, sendo que no presente estudo os ácaros tiveram acesso à aquisição do vírus por um
389 período de 5 dias.

390 Em se tratando do modo de transmissão dos fitovírus, sabe-se que para o tipo de
391 interação virus-vetor do modo persistente-circulativa ou persistente-propagativa, um tempo ou
392 período latente é requerido para que o vetor seja capaz de transmitir o vírus. Presume-se, pois
393 que é necessário algum receptor por parte do vetor, de modo que o vírus estabeleça uma
394 íntima relação com as células do mesmo e assim consiga vencer o seu sistema imune
395 (HOGENHOUT et al., 2008). Estudos mostraram que para 13 diferentes tipos de vírus que se
396 replicam no vetor, o período latente é de $15 \pm 1,7$ dias. Nesse tipo de interação, por alguma
397 razão o vírus necessita primeiro replicar-se para depois tornar-se transmissível (NAULT,
398 1991). Dessa forma, quanto maior a latência do vírus no vetor, maior será o tempo necessário
399 para a transmissibilidade do mesmo (HULL, 2002).

400 A ausência de sintomas da mancha anular do cafeeiro nas plantas infestadas com os
401 ácaros provenientes dos tratamentos investigados, pode estar relacionado provavelmente a um
402 longo período de latência do CoRSV. Estudos sobre transmissibilidade de CoRSV não são
403 encontrados com frequência na literatura. Entretanto, Mori (2003), trabalhando com formas

404 imaturas, desde larvas até adultos verificou que após um período de acesso à aquisição (PAA)
405 de 24 a 72 h e um período de acesso à inoculação (PAI) de 14 a 72 no tratamento larva mais
406 adulto 5,9% das plantas foram infectadas. Quando o autor avaliou apenas larvas, somente 5%
407 das plantas foram infectadas pelo vírus, e nas plantas infestadas somente por adultos de *B.*
408 *phoenicis* não houve expressão de sintomas. No entanto, há que se considerar o baixo PAI
409 fornecido ao ácaro (14 a 72 h), pois o autor não fez qualquer menção à possibilidade de um
410 maior período de latência que pode ser requerido pelo vírus em ácaros adultos para que estes
411 sejam efetivamente capazes de transmitir o vírus.

412 Carvalho (1999) conseguiu uma porcentagem de transmissão também baixa por larvas
413 mais adultos (13,3%), assim como quando avaliou apenas larvas (5%), no entanto um baixo
414 PAA e PAI também foram utilizados pelo autor. Este fato (baixa eficiência de transmissão)
415 foi atribuído a fatores relacionados com o tempo de alimentação, condições ambientais ou
416 ainda devido o vírus não ter sido adquirido pelos ácaros antes da transferência destes para
417 mudas saudias, pois eles provavelmente não se alimentaram nas células infectadas pelo vírus,
418 ou se alimentaram em células onde a concentração do vírus é baixa.

419 No trabalho realizado por Chagas (1978) também foi observado uma baixa
420 porcentagem de transmissão de CoRSV nas plantas infestadas (24%). É importante lembrar
421 que neste estudo, os ácaros foram provenientes de plantas de cafeeiro infectadas, ou seja, os
422 ácaros tiveram contato com o vírus desde a fase de larvas até a fase adulta. Dessa forma,
423 estudos mais detalhados sobre a eficiência de transmissão do CoRSV em função da fase do
424 vetor necessita ser investigada mais detalhadamente.

425 No presente estudo, não foi possível determinar por qPCR se o CoRSV replica no
426 interior do vetor, porque o número de moléculas do vírus foi muito baixa. Fato que pode estar
427 relacionado à baixa aquisição do vírus por *B. phoenicis* ou ainda pela possibilidade de haver
428 algum período de latência do vírus, para então replicar-se no interior do vetor. Isto é
429 corroborado pelo teste de transmissão, pois as fêmeas adultas que tiveram um PAA de cinco
430 dias, não transmitiram o vírus para nenhuma das plantas infestadas. Este fato reforça a
431 possibilidade de haver um período de latência do vírus envolvido no processo de transmissão.

432 No entanto, para confirmar essas hipóteses, são necessários estudos baseados nos
433 aspectos biológicos (eficiência de aquisição e transmissão por larvas, ninfas e adultos de *B.*
434 *phoenicis*, período de acesso a aquisição, período de acesso a inoculação, período de
435 incubação ou período latente). O completo entendimento de tal interação auxiliará no
436 desenvolvimento de medidas adequadas de manejo capazes de interferir em algum dos
437 parâmetros epidemiológicos da mancha anular do cafeeiro no campo.

AGRADECIMENTOS

438

439

440 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, à Empresa
441 Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de
442 Pessoal de Nível Superior-CAPES e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado
443 de Pernambuco – FACEPE pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho, à Dra.
444 Eliane Cristina Locali-Fabris por ceder sequências não publicadas do CoRSV para o desenho
445 dos *primers*.

446

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

447

448

449 APPLIED BIOSYSTEMS. Introdução à PCR em tempo real. Disponível em:
450 <<http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>>. Acesso em: 17 jul.
451 2010.

452 BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE, N.; OLMOS, A.; De LUIS, A.; VIDAL, E.;
453 PÉRES-PANADÉS, J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant
454 tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal Plant Pathology**, v.120,
455 p. 177-188, 2008.

456 CARVALHO, C. M. estudos biológicos, moleculares e de microscopia eletrônica do vírus da
457 mancha anular do cafeeiro. 1999. 58 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de
458 Lavras, Lavras.

459 CHAGAS, C. M. **Mancha anelar do cafeeiro: transmissibilidade, identificação do vetor e**
460 **aspectos anatomo-patológicas da espécie *Coffea arabica* L. afetada pela moléstia.** 1978,
461 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

462 CHAGAS, C. M.; KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Coffee ringspot virus vectored by
463 *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. **Experimental and Applied Acarology**,
464 Amsterdam, v.30, n. 1-3, p. 203-213, 2003.

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

- 467 CLEMENTI, M.; MENZO, S.; BAGNARELLI, P. MANZIN, A.; VALENZA, A.;
468 VARALDO, P. Quantitative PCR and RT-PCR in virology, **Genome Research**, v. 2, p. 191-
469 196, 1993.
- 470 HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4th. ed. San Diego, Califórnia, 2002, p. 485-531.
- 471 HOGENHOUT, S.A.; AMMAR, E-D.; WHITFIELD, A.E.; REDINBAUGH, M.G. Insect
472 vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review Phytopathology**.
473 Saint Paul, v. 46, p. 327-359, 2008.
- 474 KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant
475 virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and**
476 **Applied Acarology**, v.30, n. 1-3, p.135-160, 2003.
- 477 KITAJIMA, E.W.; BOARI, A. J.; CHAGAS, C.M. Detecção do vírus da mancha anular do
478 cafeeiro nos tecidos do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In:
479 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA,40, 2007, Maringá, **Suplemento...**
480 Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 135, 2007.
- 481 KITAJIMA, E.W., RODRIGUES, J.C.V., FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of
482 ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite transmitted viruses. **Scientia**
483 **Agricola**, v. 67, n.3, p.348-371, 2010.
- 484 KNORR, L.C. Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus.
485 **Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 15, 1950.
- 486 KONDO, H., MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus*
487 transmission, biological properties, and genome structure. **Experimental and Applied**
488 **Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 215–223. 2003.
- 489 LOCALI EC, FREITAS-ASTÚA J, ANTONIOLI R, BOARI AJ, MACHADO MA (2005)
490 Diagnose da mancha anular do cafeeiro através de RT-PCR. *Fitopatologia Brasileira* 30: 185.
- 491 MORI, A. E. **Propriedades biológicas do vírus da mancha anelar do cafeeiro (Coffee**
492 **ringspot virus) e controle do seu vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes**. 2003, 88f. Tese (
493 Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- 494 NAULT, L.R. Transmission biology, vector specificity and evolution of planthopper
495 transmitted plant viruses. In: DENNO, R.E & PERFECT, T.J. (eds) **Planthoppers: their**
496 **ecology, genetics and management**. Chapman and Hall, New York, 1991.
- 497 NICOLINI-TEIXEIRA, F. **Leprose do citros: interações planta x vírus x vetor**. 2008, 150
498 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- 499 OLMOS, A., BERTOLINI, E., GIL, M., CAMBRA, M. Real-time assay for quantitative
500 detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids.
501 **Journal of Virological Methods**, v. 128, p. 151–155, 2005.
- 502 RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.S.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.;
503 NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização
504 da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. *Laranja*, v. 28, n. 1-2, 2007.
- 505 SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R.K. quantitative detection of Citrus tristeza
506 virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). **Journal of**
507 **Virological Methods**, Amsterdam, v.147, p.43-53, 2008.
- 508 SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assisat
509 para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**,
510 Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- 511 ULLMAN, D.E.; GERMAN, T.L.; SHERWOOD, J.L.; WESTCOT, D.M.; CANTONE, F.A.
512 Tospovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the
513 nonstructural protein encoded by the S RNA of *Tomato spotted wilt tospovirus* is present in
514 thrips vector cells. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n.4, p. 456–463,1993.
- 515
- 516
- 517
- 518

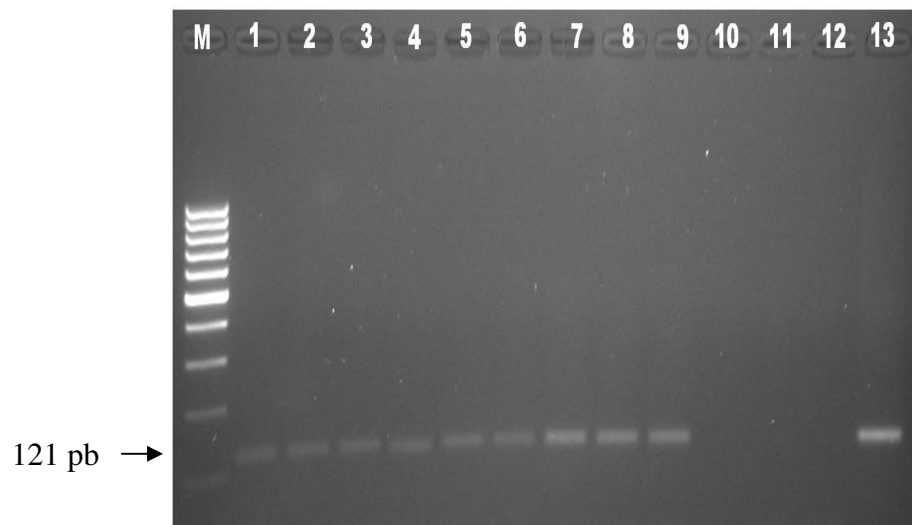


Figura 1. Gel de agarose 1% mostrando o resultado da RT-PCR para a confirmação de aquisição do CoRSV por *B. phoenicis*. M = Marcador 100 bp NORGEN; 1-amostra 1; 2-amostra 2; 3-amostra 3; 4-amostra 4; 5-amostra 5; 6-amostra 6; 7-amostra 7; 8-amostra 8; 9-amostra 9; 10-amostra 10; 11-BRANCO; 12-controle negativo; 13-controle Positivo.

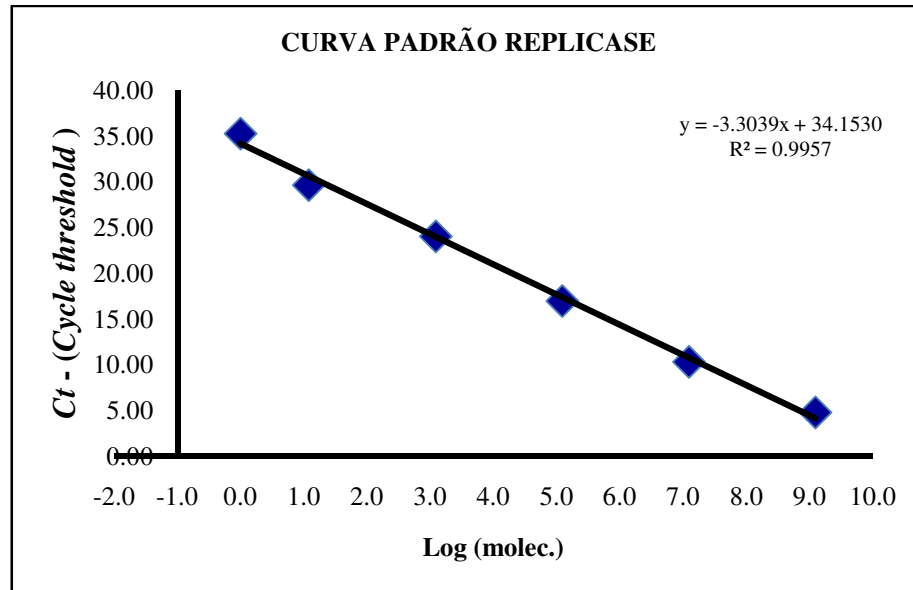


Figura 2. Curva padrão mostrando as relações lineares existente entre as concentrações do CoRSV e o *Ct*. O gráfico foi obtido pela plotagem entre os valores de *Ct* versus a concentração do RNA viral (Log. de moléculas) gerado a partir das médias das triplicatas técnicas.

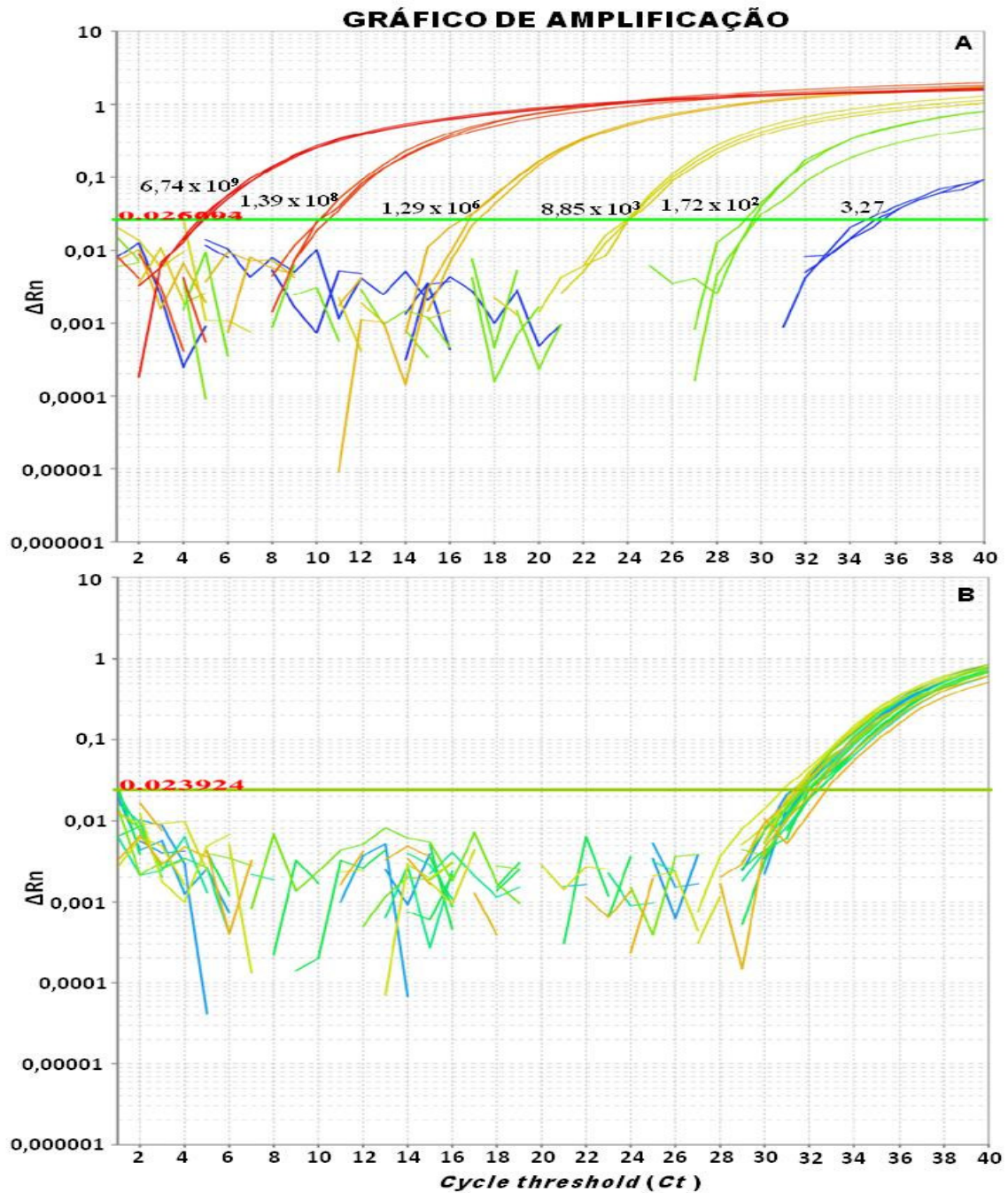


Figura 3. (A) Cinética da amplificação gerada nas seis diluições seriais (10^9 ; 10^7 ; 10^5 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1). As reações foram realizadas em triplicatas de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Rep.* do CoRSV. (B) amplicons da sequência alvo do CoRSV expressos pelo putativo gene da *Rep.* em *B. phoenicis* no tratamento planta de feijão-de-porco por qPCR.

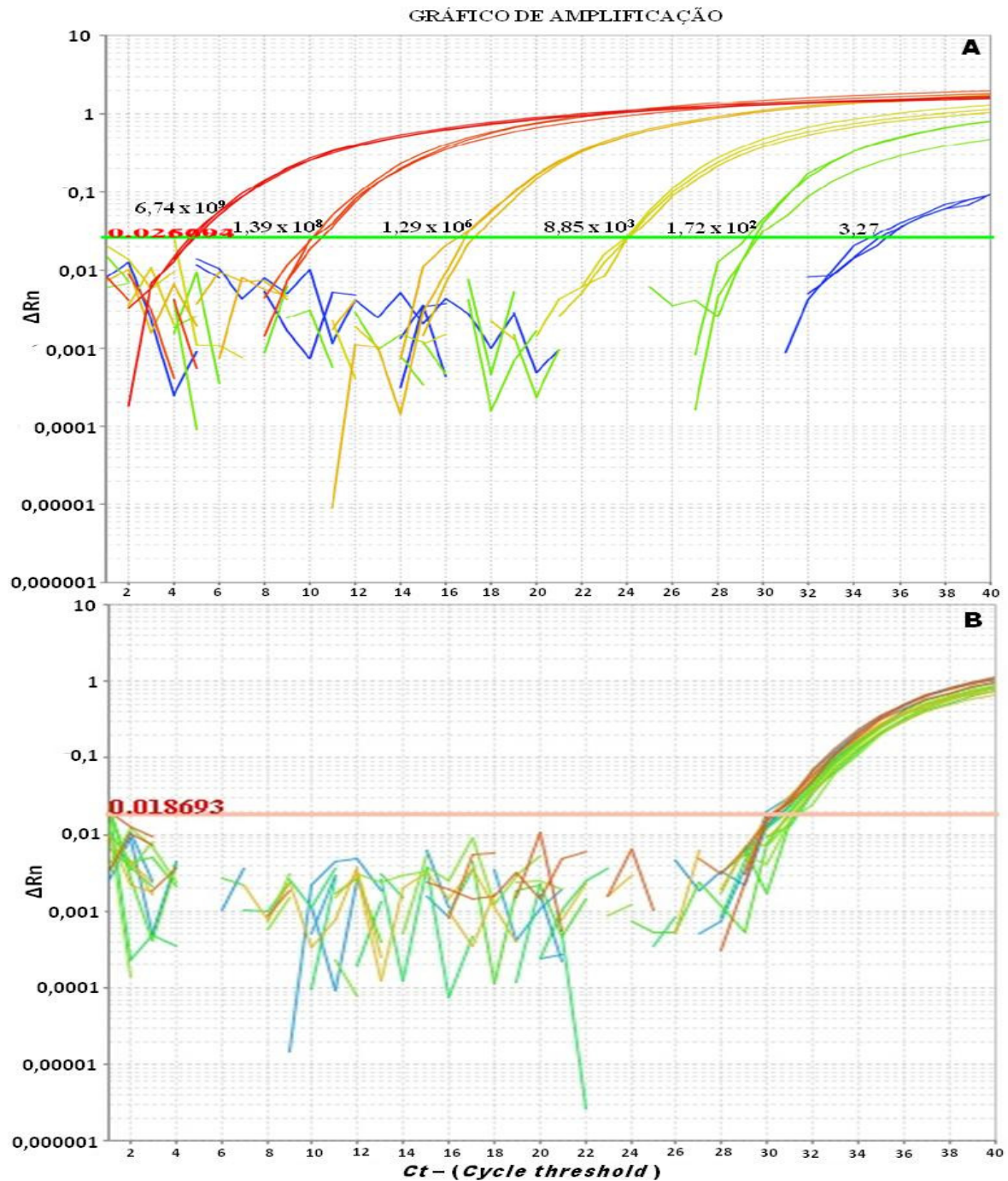


Figura 4. (A) Cinética da amplificação gerada nas seis diluições seriadas (10^9 ; 10^7 ; 10^5 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1). Realizou-se três reações (triplicatas) de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Rep* do CoRSV. (B) amplicons da sequência alvo do CoRSV expressos pelo gene *Rep* em *B. phoenicis* no tratamento planta de caféiro sintomático por qPCR.

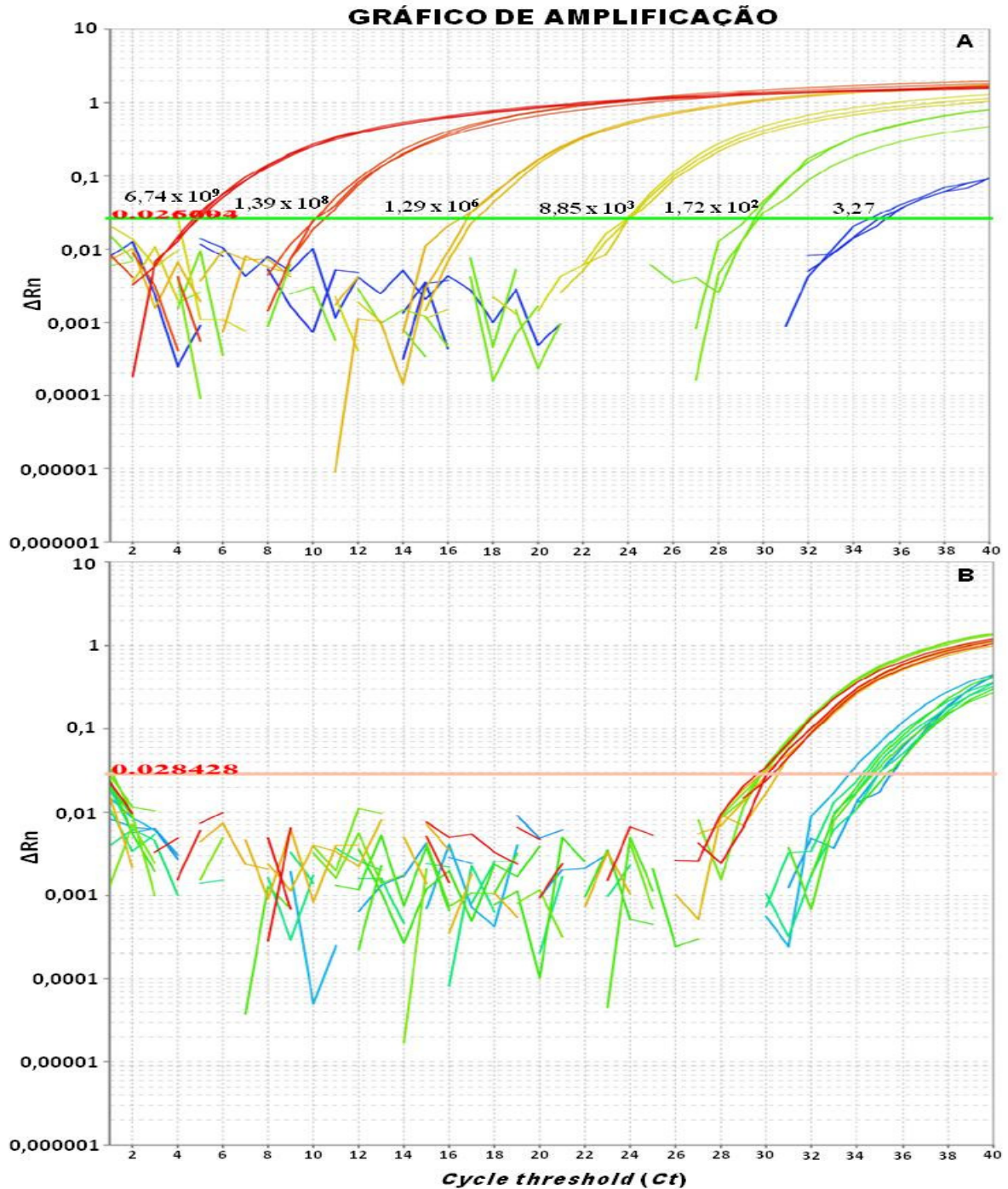


Figura 5. (A) Cinética da amplificação gerada nas seis diluições seriais (10^9 ; 10^7 ; 10^5 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1). Realizou-se três reações (triplicatas) de cada diluição, a partir de uma concentração inicial de 10^9 do DNA plasmidial contendo o inserto do gene *Rep* do CoRSV. (B) amplicons da sequência alvo do CoRSV expressos pelo gene *Rep* em *B. phoenicis* no tratamento planta de cafeeiro sadio por qPCR.

Tabela 1. Quantificação absoluta do número total de RNA transcrito do CoRSV contido em *Brevipalpus phoenicis*, expressos pelo putativo gene da *Rep*, por qPCR em tempo real para todos os tratamentos estudados.

Hospedeiros	Tempos					
	0 (D.A.I.) ^a			21 (D.A.I.)		
	<i>Ct</i> ±D.P. ^b	C.V.(%) ^c	Nº de cópias ^d	<i>Ct</i> ±D.P. ^b	C.V.(%) ^c	Nº de cópias ^d
PFP ^e -1 ^f	33,92±0,59	1,73	1,18 a A	32,90±0,10	0,32	2,40 a A
PFP-2 ^g	33,39±0,25	0,74	1,70 a A	33,76±0,42	1,24	1,32a A
PFP3 ^h	33,95±0,04	0,13	1,15 a A	33,31±0,27	0,81	1,80a A
CS ⁱ -1	30,67±0,49	1,60	11,3 abA	30,50±0,13	0,42	12,8 bA
CS-2	31,22±0,27	0,88	7,70 abA	31,36±0,39	1,23	7,00 bA
CS-3	30,90±0,34	1,10	9,66 abA	30,44±0,24	0,80	13,3 bA
CSA ^j -1	30,08±0,31	1,02	1,71 bB	33,86±0,81	2,38	1,92a A
CSA-2	30,15±0,35	1,15	16,3 bB	34,03±0,62	1,83	2,55a A
CSA-3	29,81±0,05	0,18	20,6 bB	35,73±0,97	2,70	1,57a A

^adias após a infestação (transferência dos ácaros para os tratamentos); médias do *Cycle threshold* (*Ct*) e desvio padrão (D.P.) obtidos em triplicatas; ^ccoeficiente de variação (C.V.); ^dnúmero de cópias do RNA viral/ μ L obtido por amostra em cada tratamento; ^ePFP - planta de feijão-de-porco; ^{f,g,h}repetições – 1, 2 e 3, respectivamente; ⁱCS - cafeeiro sintomático; ^jCSA - cafeeiro sadio.

Tabela 2. Detecção do CoRSV em *B. phoenicis* por qPCR através do sistema TaqMan[®], avaliados tanto no fator hospedeiro, quanto no fator tempo, considerando os valores médios de *Ct*, obtidos das triplicatas de cada repetição.

Hospedeiros	Tempos de coleta					
	0 (D.A.I.) ¹	21 (D.A.I.)				
Planta de feijão-de-porco	33,75aA	33,32bA				
Cafeeiro sintomático	30,93bA	30,77cA				
Cafeeiro sadio	30,02bB	34,54aA				
* F ² _(Tratamentos)	36,68**	C.V. (%) ³	1,67	D.M.S. ⁴	0,95 ^a	1,17 ^b

¹dias após a infestação (transferência dos ácaros para os tratamentos); * resumo da análise de variância; ²estatística do teste F; **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); ³coeficiente de variação em porcentagem; ⁴^{a,b}diferença mínima significativa; ^ahospedeiros; ^btempos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Não foi observado aumento de partículas do CiLV-C após 21 dias de avaliação no ácaro vetor, indicando que possivelmente não replicação do vírus no vetor.
- Foi observado uma baixa quantidade de partículas do CoRSV em ácaros, indicando possivelmente baixa aquisição viral por ácaros adultos e/ou ocorrência de um período de latência elevado (próprio dos vírus replicativos), de modo a não tornar possível sua quantificação.
- No patossistema CiLV-C-*B.phoenicis*, houve a transmissão do vírus para plantas saudias, mostrando que nesse caso a latência foi bem menor, quando comparado com o CoRSV. Latência baixa é peculiar aos vírus circulativos;
- No caso do CoRSV não houve transmissão deste para plantas saudias reforçando a idéia de replicação, pois o que está envolvido nesse caso é a latência do vírus;
- A qPCR comprovou que *B. phoenicis* na fase adulta foi capaz de adquirir os dois vírus estudados, porém apenas um foi transmissível;
- A qPCR mostrou-se mais sensível que a microscopia eletrônica de transmissão, razão esta que justifica o seu emprego em estudos de interação vírus-vetor;
- Os resultados revelam tratar-se de dois patossistemas bastante complexos, nos quais estão envolvidos fatores tanto do ácaro, quanto do vírus que precisam ser mais explorados;
- Este estudo é pioneiro na tentativa de quantificação do CoRSV no ácaro vetor por qPCR, permitindo fazer inferências que poderão ser úteis em novas pesquisas dessa natureza.