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

Caracterização biológica e molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* Chlorotic Spot Virus- CLCSV)

Renata Takassugui Gomes

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Renata Takassugui Gomes
Bacharel em Ciência dos Alimentos

Caracterização biológica e molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* Chlorotic Spot Virus- CLCSV)

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

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2009

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

Gomes, Renata Takassugui
Caracterização biológica e molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* Chlorotic Spot Vírus - CLCSV) / Renata Takassugui Gomes. - - Piracicaba, 2009.
55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Ácaros 2. Doenças de plantas 3. Histologia vegetal 4. Plantas ornamentais 5. Vírus de plantas I. Título

CDD
635.9

G633c

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

À minha família pelo apoio constante

Dedico

Aos meus amigos

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela orientação, confiança, disponibilidade e pela maneira que me recebeu em seu laboratório.

Á Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A Dra. Beatriz Apezzatto-da-Glória e aos colegas do laboratório de Anatomia Vegetal pelo apoio e dedicação na execução deste trabalho.

A Dra. Juliana Freitas Astúa e aos colegas do Centro APTA "Sylvio Moreira" pelo apoio e incentivo nas análises moleculares.

Ao Prof. Dr. Jorge Marques Rezende e aos colegas do laboratório de Virologia vegetal pelo apoio na realização deste trabalho.

A Alessandra Boari pelo auxilio na purificação do vírus.

A Andreia Nakatani pelo auxílio nas análises moleculares e pela hospedagem.

A Aline Martins pelo curso intensivo de Corel Draw.

Ás minhas amigas e colegas de mestrado Helen, Raphaelle e Érika pela amizade, apoio e compreensão além pelos bons momentos que me proporcionaram durante todo esse período.

Às minhas amigas Ana Paula, Juliana, Simone , Lixa, Dacorte, Camila e Mulan pela amizade e pelos bons momentos em Piracicaba.

Aos colegas do NAP-MEPA Elisete, Francisco, Paulo, Renata e Renato pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal Adriana, Anielca, Aline Bombo, Aline Martins, Graziela, João Marcelo, João Paulo, Juliana Fernando, Juliana Mayer, Magda, Marli e Marta pelo apoio e pela amizade.

Aos colegas do Centro APTA Sylvio Moreira Amélia, Chris, Fernanda, Kelly, Mariana, Raquel, Renata, Samanta e Thiago pelo apoio e amizade que demonstraram por mim.

À minha avó Guiomar e minha tia Carmem por todo o apoio e carinho que me deram.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio e compreensão durante esse período.

Ao Fabio Motta pelo companheirismo e otimismo em todos os momentos.

“Loucura é fazer as coisas da mesma forma e esperar que o resultado seja diferente”
Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....8
ABSTRACT.....9
1 INTRODUÇÃO.....10
2 DESENVOLVIMENTO.....12
2.1 Revisão Bibliográfica.....12
2.1.1 O gênero Clerodendrum.....12
2.1.2 Ácaros *Brevipalpus*.....13
2.1.3 Vírus transmitidos por *Brevipalpus*.....15
2.1.4 Mancha clorótica de *Clerodendrum*.....20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....22
3.1 Material vegetal, fonte de inóculo e manutenção 22
3.2 Purificação do vírus.....22
3.3 Identificação do vírus utilizando a técnica PTA-ELISA.....23
3.4 Caracterização Molecular do ClCSV.....24
3.4.1 Obtenção do cDNA utilizando RT-PCR.....24
3.4.2 Seqüenciamento a partir do produto de PCR.....26
3.4.2.1 Clonagem dos produtos de PCR.....26
3.4.2.2 Seleção e estoque de clones positivos.....26
3.4. 2.3 Extração do DNA plasmidial.....27
3.4.2.4 Reação de sequenciamento.....27
3.4.2.5 Confirmação das sequencias dos amlicons.....28
3.5 Microscopia de luz.....28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....30
4.1 Inoculação Mecânica e manutenção e manutenção do inóculo.....30
4.2 Purificação do Vírus.....31
4.3 Identificação sorológica do vírus por PTA-ELISA.....32
4.4 Caracterização Molecular.....34
4.4.1 Amplificação por RT-PCR.....34

4.4.2 Seqüenciamento a partir do produto de PCR.....36
4.5 Microscopia de luz e citopatologia.....37
4.5.1 Análises anatômicas dos tecidos das hospedeiras.....37
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....46
REFERÊNCIAS.....47

RESUMO

Caracterização biológica e molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* Chlorotic Spot Virus - ClCSV)

O gênero botânico *Clerodendrum* pertence à família Lamiaceae e compreende várias espécies ornamentais, geralmente trepadeiras, das quais as mais comumente cultivadas são coração-sangrento (*C. x speciosum* Tiejism. & Binn.) e lágrima-de-Cristo (*C. thomsonae* Balf.). Manchas cloróticas e necróticas em folhas de coração-sangrento foram observadas pela primeira vez em um jardim de Piracicaba, SP, associadas à infestação com *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). Exames de secções de tecidos das lesões foliares ao microscópio eletrônico revelaram ocorrência de efeitos citopáticos do tipo nuclear e concluiu-se que os sintomas eram causados por um vírus transmitido por *Brevipalpus* (VTB), o qual foi tentativamente designado de mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* chlorotic spot virus- ClCSV). O ClCSV é transmitido mecanicamente de coração-sangrento para coração-sangrento e em ensaios preliminares foi transmitido mecanicamente e por *Brevipalpus phoenicis* para várias outras plantas, além da ocorrência de sua disseminação natural por esses ácaros para outras espécies. Ocorre a infecção sistêmica nas hospedeiras *Chenopodium quinoa* Will. e *C. amaranticolor* Coste & Reyn. infectadas com ClCSV caso as plantas sejam mantidas por cerca de 2 semanas entre 28-30 ^{o}C. Utilizando-se estas plantas realizou-se a purificação parcial do vírus. Este trabalho apresenta a caracterização biológica e molecular do ClCSV. Os resultados dos testes PTA-ELISA e RT-PCR demonstraram a detecção do ClCSV em diversas hospedeiras, além da análise da reação sorológica e molecular deste vírus com os outros VTBs do tipo nuclear. O seqüenciamento do produto de PCR revelou que as seqüências de nucleotídeos apresentaram similaridade com a polimerase de OFV (Orchid Fleck Virus), outro VTB do tipo nuclear. Além da identificação sorológica do vírus foram realizadas análises morfo-anatômicas para visualização das alterações causadas pelo ClCSV em tecidos de *Clerodendrum x speciosum* e em hospedeiras infectadas.

Palavras-chave: ClCSV; *Brevipalpus phoenics*; *Clerodendrum x speciosum*; Genoma viral; Histopatologia

ABSTRACT

Biological and molecular characterization of *Clerodendrum* chlorotic spot virus (*Clerodendrum* chlorotic spot virus - ClCSV)

The botanical genus *Clerodendrum* belongs to the family Lamiaceae and includes several ornamental species, usually climbing, and heart-bloody (*C. x speciosum* Tiejism. & Binn.) and tear-in-Christ (*C. thomsonae* Balf.) are among the most cultivated. Necrotic and chlorotic spots on leaves of heart-blood have been observed for the first time in a garden of Piracicaba, associated with an infestation *of Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). Sections of diseased tissues examined in the electron microscope revealed characteristic cytopathic effects of the nuclear type and concluded that the symptoms were caused by a virus transmitted by Brevipalpus (VTB), tentatively named *Clerodendrum* chlorotic spot virus (ClCSV). This virus is transmitted through mechanical inoculation from heart-bloody to heart-bloody and in preliminary tests mechanically and by mites for several other plants, in addition to the natural occurrence of its spread to other species. Systemic infection occurs in the host *Chenopodium quinoa* Will. and *C. amaranticolor* Coste & Reyn. infected with ClCSV if the plants are kept at 28-30°C for about 2 weeks. These plants were used for partial purification of vírus. This study presents the biological and molecular characterization of ClCSV. Through the PTA-ELISA and RT-PCR tests was possible to detect the ClCSV in different host, in addition to the analysis of serological and molecular reaction of this virus with other type of nuclear VTBs. From the sequencing of the PCR product was obtained from nucleotide sequences that showed similarity to the polymerase of OFV (Orchid Fleck Virus), another type of nuclear VTB. Morpho-anatomical analysis were performed to see the changes caused by ClCSV in tissues of *Clerodendrum x speciosum* and other infected hosts. It was possible to observe the occurrence of hypertrophy, cell plasmolisis and the reduction of starch grains in the áreas injured in all plants infected by ClCSV.

Keywords: ClCSV; *Brevipalpus phoenics*; *Clerodendrum x speciosum*; Viral genome; Histopathology

1 INTRODUÇÃO

Clerodendrum é um gênero botânico pertencente à família Lamiaceae e compreende várias espécies de importância hortícola e são utilizadas na culinária, medicina, indústria farmacêutica e cosmética como o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.), hissopo (*Hyssopus officinalis* L.), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), lavanda (*Lavandula* spp.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), segurelha (*Satureja hortensis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (KRUPPA et al., 2008), além de espécies ornamentais, muito cultivadas em jardins residenciais e parques, cobrindo muros e cercas (LORENZI; SOUZA, 2001). Essa família apresenta distribuição cosmopolita, com cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7500 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 350 espécies distribuídas em 26 gêneros (LORENZI; SOUZA, 2005).

Plantas de *Clerodendrum x speciosum* (Tiejism. & Binn.) que apresentavam folhas com manchas cloróticas e necróticas foram observadas pela primeira vez em um jardim residencial de Piracicaba, SP, associadas à infestação com ácaros identificados como *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). As lesões foliares foram reproduzidas após transferência de ácaros de plantas com sintomas para plantas sadias e exames de secções de tecidos das lesões foliares ao microscópio eletrônico revelaram a ocorrência de efeitos citopáticos do tipo nuclear dos vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB) (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2003a). Concluiu-se então que os sintomas eram causados por um vírus transmitido pelo ácaro Brevipalpus (VTB), e o vírus designado como mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* chlorotic spot virus- ClCSV). Sintomas semelhantes foram encontrados em *C. thomsonae* (Balf.,) e *C. splendens* (G. Don.) em Piracicaba e outras cidades dos estados de São Paulo, Santa Catarina, Amazonas e Distrito Federal, associados à infestação com o ácaro *Brevipalpus*, sendo que em *C. thomsonae* pontos amarronzados também foram observadas em pétalas de flor quando infestadas por *Brevipalpus* (KITAJIMA et al., 2008b).

Vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) têm sido referenciados na literatura desde 1930, quando se demonstrou o envolvimento de *B. obovatus* (Donnadieu) na disseminação da leprose dos citros na América do Sul (SPEGAZZINI, 1920; VERGANI, 1945). Além da leprose dos citros, que se destaca como a virose mais importante transmitida pelo ácaro

Brevipalpus, este também é o vetor de uma crescente lista de vírus de plantas, atualmente cerca de 40, geralmente ornamentais, como mancha clorótica de *Clerodendrum*, mancha anular em *Solanum violaefolium*, mancha anular de *Ligustrum*, mancha anular em *Malvaviscus* entre outros. Pode-se citar outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB) de importância econômica, como o "Orchid fleck vírus" (OFV), mancha anular do café (Coffee ringspot vírus- CoRSV) e pinta verde do maracujá (passion fruit green spot vírus- PFGSV) (KITAJIMA et al., 2003b, 2006). Foi demonstrado que existem dois tipos distintos de VTB, referidos como citoplasmático e nuclear, conforme a morfologia das partículas e os efeitos citopatológicos observados (KITAJIMA et al., 2003). Contudo, poucos deles puderam ser devidamente caracterizados: apenas CiLV-C e OFV, respectivamente do tipo citoplasmático e nuclear, tiveram seus genomas seqüenciados por completo (KONDO et al., 2003; LOCALI et al., 2006; PASCON et al., 2006). Há informações fragmentárias sobre o genoma do CoRSV, representante do tipo nuclear (LOCALI et al., 2005b) e da mancha anular de *Solanum violaefolium* (*S. violaefolium* ringspot virus- SvRSV), do tipo citoplasmático (FERREIRA, 2005), proporcionando assim a criação de ferramentas moleculares para detecção destes vírus.

Dentre os vírus transmitidos por *Brevipalpus*, o causador da mancha clorótica de *Clerodendrum* em ensaios preliminares foi transmitido de forma experimental e natural por *B. phoenicis* (Geijskes) tanto entre *C. x speciosum* como para várias outras espécies e também mecanicamente (KITAJIMA et al., 2005b). Nas plantas-teste *Chenopodium quinoa* Willd. e *C. amaranticolor* Coste & Reyn., além das lesões locais, o vírus pode ocasionar infecção sistêmica caso as plantas sejam submetidas a temperatura de 28-30 ^{o}C, por cerca de 2 semanas (ALCÂNTARA et al., 2005), como verificado com OFV e CoRSV (KONDO et al., 2003; BOARI et al., 2003b).

Como parte das tentativas de conhecer melhor os VTBs e procurar estabelecer suas relações filogenéticas, avaliar sua importância na epidemiologia e nas perdas econômicas, propõe-se como estratégia o estudo do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (ClCSV), já que este apresenta facilidades na obtenção de materiais infectados.

Este trabalho tem como objetivo fazer uma caracterização mais compreensiva do ClCSV, englobando seus aspectos biológicos: gama de hospedeiras e sintomatologia, caracterização molecular e sorológica analisando o relacionamento com outros VTBs, desenvolvimento de técnicas imunológicas e moleculares para sua detecção e citopatologia.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O gênero C*lerodendrum*

Devido à nova classificação filogenética, o gênero *Clerodendrum*, que antes era considerado como um membro da família *Verbenaceae* agora pertence à família Lamiaceae (STEANE et al., 2004). O gênero *Clerodendrum* abrange cerca de 400 espécies de plantas, é nativo de regiões tropicais e de climas quentes temperados e é predominantemente distribuído na África e na Ásia.

As plantas de *Clerodendrum* podem se apresentar na forma de trepadeiras, árvores e arbustos (KVL, 2006). As espécies ornamentais mais comumente cultivadas são *C. x speciosum* Tiejism. & Binn., conhecida como coração-sangrento, *C. thomsonae* Balf., conhecida como lágrima-de-Cristo e *C. splendens* G. Don., conhecido como Clerodendrum vermelho.

Clerodendrum x speciosum Tiejism. & Binn. apresenta-se na forma de arbusto escandente, de textura semi-herbácea, de florescimento vistoso, resultante da hibridização de *Clerodendrum splendens* G. Don. Com *C. thomsonae* Balf., apresenta inflorescências terminais, constituídas por numerosas flores vermelhas, de cálices persistentes, vermelho claras com a idade e geralmente é conduzido à maneira de uma trepadeira. (LORENZI; SOUZA, 2001).

C. thomsonae Balf. é caracterizado como uma trepadeira semi-herbácea, muito ramificada, originária da África Ocidental, de ramagem longa, de folhagem e florescimento decorativos. Apresenta folhas ovaladas, verde-escuras e brilhantes fortemente marcadas pelas nervuras e inflorescências ramificadas, com muitas flores de cálice branco inflado e corola expandida vermelha (LORENZI; SOUZA, 2001).

C. splendens G. Don. apresenta-se como trepadeira semi-lenhosa, originária da África Tropical, de florescimento vistoso e de ramagem longa. Possui folhas coriáceas, simples, verde-escuras e corrugadas e inflorescências terminais grandes, em corimbos densos, constituídas por numerosas flores de cor vermelho-viva. Assim como *C. x speciosum* Tiejism. & Binn. e *C. thomsonae* Balf. é utilizada para o revestimento de muros, paredes, grades e pórticos a pleno sol, é sensível a geadas, aceita podas moderadas de contenção e multiplica-se através de estacas (LORENZI; SOUZA, 2001).

2.1.2 Ácaros *Brevipalpus*

A família Tenuipalpidae apresenta mais de 622 espécies em 30 gêneros descritos no mundo todo, sendo que os ácaros do gênero *Brevipalpus* têm sido considerados as pragas mais importantes entre os Tenuipalpídeos (CHILDERS et al., 2003). O *Brevipalpus* spp é uma espécie polífaga e apresenta distribuição cosmopolita, tendo sido encontrado na África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, América do Sul e Ilhas do Pacifico (HARAMOTO, 1969). O gênero compreende mais de 300 espécies, sendo *B. phoenicis* (Geijskes), *B. californicus* (Banks) e *B. obovatus* Donnadieu as espécies reconhecidas como vetores de fitoviroses, tais como a da leprose do citros, mancha anular do cafeeiro, "Orchid fleck", entre outros. As três principais espécies de *Brevipalpus* foram relatadas em 928 espécies de plantas em 513 gêneros distribuídas em 139 famílias e estão distribuídas em toda região tropical e subtropical do planeta (CHILDERS et al., 2003).

A lista de plantas hospedeiras é constituída por monocotiledôneas, dicotiledôneas, plantas anuais e perenes que incluem inúmeras plantas de importância na agricultura, plantas medicinais, ervas culinárias, plantas ornamentais lenhosas e inúmeras espécies de árvores (CHILDERS et al., 2003). Maia e Oliveira (2004) observaram que dentre as plantas mais comumente utilizadas como cercas-vivas e quebra-ventos em pomares cítricos, o malvavisco, o hibisco e o urucum são altamente favoráveis à colonização de *B. phoenicis* e dentre as plantas invasoras, o picão-preto, trapoeraba, guanxuma e mentrasto podem constituir importante foco de infestação do ácaro.

Os ácaros *Brevipalpus* são ácaros achatados dorso-ventralmente com dimensões variando entre 0,2 e 0,4 mm (CHILDERS et al., 2003). Sua taxonomia tem sido baseada essencialmente em caracteres morfológicos externos, como setas dorsais, padrões do opistosoma dorsal, número de soleídeos no 2º par de patas, etc. (WELBOURN et al., 2003; MESA COBO, 2006), porém já existem tentativas de uma caracterização baseada em dados moleculares.

Brevipalpus reproduzem-se em geral por partenogênese telítoca, onde fêmeas não fecundadas dão origem a fêmeas idênticas à progenitora, embora ocasionalmente surjam machos (CHILDERS et al., 2003). Os machos de *B. phoenicis* geralmente são raros em populações naturais, aproximadamente 1% (HELLE et al ., 1980). Pijnacker e Heller (1981) ao descreverem a anatomia dos órgãos reprodutores de machos e fêmeas de *B. obovatus* sugerem que apesar de o macho copular, não ocorreria a fertilização. A presença de endossimbiontes do grupo do

Candidatus Cardinium foi relatada por Weeks et al. (2001) e sua presença induziria a feminilização dos machos, ocasionando esta elevada proporção de fêmeas em ambientes naturais (NOVELLI et al., 2006). Os machos, quando presentes, são livres do endossimbionte (NOVELLI, et al., 2007). Tais bactérias têm sido encontradas em populações de *B. phoenicis, B. obovatus* e *B. californicus,* em diferentes regiões do mundo (NOVELLI et al., 2005; CHIGURI; MIURA, 2005; GROOT, 2006; KITAJIMA et al., 2007). Estudos moleculares demonstraram que o endossimbionte ocorre em todas as fases de desenvolvimento do ácaro e através de testes moleculares observou-se que não há diferença na aquisição do vírus da leprose entre machos e fêmeas do ácaro, demonstrando que o ácaro não depende do seu endossimbionte para transmitir o vírus (NOVELLI et al., 2007). Porém resultados sobre aquisição e inoculação do vírus da leprose sugerem que, apesar da aquisição ser realizada por machos e fêmeas, a inoculação não ocorre de maneira uniforme, já que para as plântulas infestadas com ácaros machos foi necessário um tempo maior para o aparecimento dos sintomas (NOVELLI et al., 2006; NOVELLI et al., 2007).

O ciclo de vida típico do ácaro *Brevipalpus* compreende ovo, larva, protoninfa, deuteroninfa e adulto, sendo que entre cada estágio ocorre o desenvolvimento imóvel, porém fisiologicamente ativo, denominado crisálida (CHILDERS, 2003). A duração de cada estágio de vida é dependente das condições ambientais, podendo em condições favoráveis ter uma sobrevida de quase 2 meses, com postura de 30-40 ovos (CHIAVEGATO, 1986). O ovo do ácaro apresenta forma elíptica, cor vermelha brilhante e possui em média 84µm de comprimento e 60 µm de diâmetro. Os ovos são depositados em fendas, fissuras ou outros nichos protegidos na superfície de frutos cítricos e tendem a ser depositado em aglomerados com mais de uma fêmea. Os ovos aderem à superfície das plantas devido a uma substância adesiva neles presente (CHILDERS et al., 2003).

B. phoenicis alimenta-se sugando as células superficiais através do estilete e podem causar lesões em folhas, ramos e frutos pela injeção da saliva. Na superfície foliar de citros, o ácaro geralmente se alimenta ao longo das e nervuras laterais e centrais (CHILDERS et al. 2003). Segundo Mothes e Seitz (1982) o dano causado durante a alimentação do ácaro pode ocorrer devido a três fatos: durante a alimentação um vácuo é criado causando rompimento celular, as células adjacentes a aquelas danificadas podem ser alteradas pela saliva do ácaro ou o processo de degeneração nas células não perfuradas é resultado da reação dos tecidos danificados das plantas.

Porém, além destes efeitos, as 3 espécies acima referidas transmitem pelo menos 2 tipos de vírus, o citoplasmático e o nuclear. Dados de transmissão, microscopia eletrônica e ensaios moleculares sugerem que o tipo nuclear seria transmitido pelo ácaro de maneira circulativa/propagativa e o citoplasmático, de maneira circulativa (KONDO et al., 2003; KITAJIMA et al., 2007, 2008a).

2.1.3 Vírus transmitidos por *Brevipalpus*

Os primeiros relatos do envolvimento de ácaros *Breviplapus* com transmissão de vírus deu-se em fins da década dos 1920 quando se constatou o envolvimento de *B. obovatus* com a disseminação da "lepra explosiva" dos citros (leprose) na América do Sul (SPEGAZZINI, 1920; VERGANI, 1945). Mais tarde, constatou-se que no Brasil este vírus era transmitido por *B. phoenicis* (MUSUMECCI; ROSSETI, 1963). Nos EUA há menção de sua transmissão pelas 3 espécies (KNORR, 1968). Foi também demonstrado o envolvimento de *B. phoenicis* como vetor dos vírus da mancha anular do cafeeiro (CHAGAS, 1978) e da "mancha verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 1997; KITAJIMA et al., 2003b). No Japão observou-se que o vírus do "Orchid fleck" era transmitido por *B. californicus* (MAEDA et al., 1998). A partir do ano 2000 verificou-se que numerosos vírus, encontrados principalmente em ornamentais, eram transmitidos por *B. phoenicis* e/ou *B. obovatus* (FREITAS-ASTÚA, 2004; KITAJIMA et al., 2003a; KITAJIMA, 2005a).

Uma característica marcante destes vírus é a de causar apenas lesões localizadas, envolvendo apenas os tecidos ao redor do sítio onde houve a inoculação, raramente tornando-se sistêmico. As lesões causadas por VTBs nas folhas usualmente têm perfil circular a elíptico, geralmente acompanhando as nervuras. Podem ser manchas ou anéis cloróticos, anéis concêntricos ou manchas necróticas. Em folhas senescentes, podem aparecer como manchas ou anéis verdes. Em ramos produzem manchas cloróticas que tendem a necrosar. Folhas lesionadas tendem a cair prematuramente. Quando as lesões são numerosas e se fundem, causam anelamento e morte do ramo (KITAJIMA et al., 2003a). Há apenas uma observação de lesões em flores de *Clerodendrum thomsonae* associada à infecção por VTB (KITAJIMA et al., 2008b).

Em citros, a virose caracteriza-se pelo surgimento de lesões cloróticas/anelares nas folhas, lesões corticosas nos ramos e lesões deprimidas cloróticas/pardas nos frutos (RODRIGUES et al.,

2003). Geralmente os sintomas são visíveis 17 a 60 dias após a infecção nos locais onde o ácaro se alimenta (BASSANEZI et al., 2002). As lesões causadas reduzem o valor comercial e também induzem a queda prematura dos frutos (RODRIGUES et al., 2003).

Excetuando-se o "Orchid fleck virus" (OFV) que é de distribuição mundial, explicável pelo intenso intercâmbio de material vivo que deve dispersar o ácaro vetor e o vírus, e um possível VTB em violeta na Austrália (no caso, o envolvimento com ácaro não é citado), todos os demais casos conhecidos foram descritos no continente americano (KITAJIMA et al., 2003a, 2005a). Dada a distribuição mundial das 3 espécies de *Brevipalpus*, vetoras de VTBs (CHILDERS et al., 2003), em tese os VTBs poderiam ocorrer em outras partes do mundo, mas os limitados levantamentos feitos na África do Sul, Austrália e Sudeste Asiático (Tailândia, Singapura e Hong Kong) não os detectaram (E.W. Kitajima & J.C.V. Rodrigues, comunicação pessoal) e tampouco há relatos na literatura. Há registros antigos da presença da leprose dos citros no Sudeste Asiático e África do Sul, baseados em sintomas (FAWCETT, 1936), mas não foram posteriormente confirmadas. O primeiro estudo ultra-estrutural de VTBs foi feito com o OFV no Japão. Doi et al. (1969) detectaram partículas curtas em forma de bastonete no citoplasma e núcleo associado à inclusão nuclear. Posteriormente observações similares foram feitas em várias partes do mundo (KONDO et al., 2003). O segundo relato foi em lesões de leprose do citros no Brasil, com observações similares (KITAJIMA et al., 1972). Mas nos trabalhos posteriores, na maioria das amostras de leprose foi observado outro tipo de partícula, baciliforme e curto, em cavidades do retículo endoplasmático associado a uma inclusão densa e vacuolada no citoplasma (KITAJIMA et al., 1974; COLARICCIO et al., 1995). Em observações posteriores constatou-se que todos os casos de VTBs causavam alterações celulares de um ou outro tipo, e que foram referidos como tipo nuclear e citoplasmático, respectivamente (KITAJIMA et al., 2003a) convencionando-se designar respectivamente de leprose tipo nuclear (CiLV-N) e citoplasmática (CiLV-C) (RODRIGUES et al., 2003). Há registros de outras espécies de plantas que podem se infetar tanto pelo tipo nuclear como citoplasmático de VTB como *Hibiscus*, *Clerodendrum*, *Solanum violaefolium*, *Salvia*, *orquídeas* entre outros, sendo que estas plantas poderiam se infetar pelos dois tipos, e em alguns casos, simultaneamente (KITAJIMA et al., 2003a). Não há evidências ainda que um único ácaro possa transmitir simultaneamente os dois tipos.

Do ponto de vista econômico, a leprose dos citros é sem dúvida a mais importante virose transmitida pelo ácaro *Brevipalpus*. No Estado de São Paulo, o maior produtor de laranjas para suco no mundo, com mais de 200 milhões de laranjeiras, gastam-se com acaricidas para o controle do *Brevipalpus,* evitando dessa forma a disseminação da leprose, mais de US$ 80 milhões/ano (RODRIGUES et al., 2003) além de eventuais perdas diretas causadas pelos vírus nas plantas afetadas. Descrita originalmente nos EUA, no estado da Flórida, no início do século 20 (CHILDERS et al., 2003c) a doença atualmente se acha espalhada na América do Sul e América Central. A leprose desapareceu dos EUA a partir dos anos 1960 (CHILDERS et al., 2003c), mas constata-se que a doença ruma para o norte, tendo sido verificado nos últimos anos sua ocorrência na Bolívia, Colômbia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Guatemala, Honduras além de ter sido registrada no sul do México (RANGEL et al., 2000; ARAYA-GONZALES, 2000; DOMINGUEZ et al., 2001; GÓMEZ et al., 2005; LEON et al., 2006; BASTIANEL et al., 2007). Assim é enorme a possibilidade de ocorrer a reinfecção da leprose nos pomares dos EUA, e também a dispersão da doença para as ilhas do Caribe. No Brasil sua presença tem sido constatada em praticamente todo o país, do Rio Grande do Sul ao Amazonas (FREITAS-ASTUA et al., 2004; BASTIANEL et al., 2007). O vírus da leprose prevalente é o tipo citoplasmático (CiLV-C), que foi recentemente seqüenciado (PASCON et al., 2006) o que foi possível a partir da obtenção de dsRNA do vírus (RODRIGUES, 2000; LOCALI et al., 2003a), tendo sido já criado métodos moleculares para sua detecção (LOCALI et al., 2003b). Possuem 2 segmentos de ssRNA (9 e 5 kb) senso positivo, e pela seqüência e organização genômica, o vírus seria distinto de todos outros conhecidos. Assim, de início considerado membro tentativo de rhabdovírus, dada alguma semelhança na morfologia, definitivamente não faz parte desta família tendo sido sugerido o novo gênero *Cilevirus* para acomodá-lo. O tipo nuclear (CiLV-N) é de rara ocorrência, tendo sido constatado em alguns municípios dos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul e também no norte do Panamá, geralmente em pomares de fundo de quintal e em regiões mais frias. Os sintomas causados pelo CiLV-N são essencialmente similares aos do CiLV-C, embora as lesões tendam a ser menores e mais cloróticas. Ensaios moleculares comprovaram que CiLV-C e N são vírus distintos (FREITAS-ASTUA et al., 2005), confirmando os dados citopatológicos (RODRIGUES et al., 2003). CiLV-N assim como demais VTB do tipo nuclear devem pertencer ao gênero *Dichorhabdovirus*, recentemente proposto para o OFV após o seqüenciamento

completo de seu genoma (KONDO et al., 2006) e que revelou similaridades na organização genômica com membros da família *Rhabdoviridae*, sendo, contudo, de genoma bipartido.

Locali-Fabris et al. (2008) lograram expressar a proteína p29, capsidal, do CiLV-C em bactéria e produzir anti-soro específico que permite a detecção do CiLV-C por Western-blot, ELISA e imunolocalização *in situ* tanto na planta como no ácaro vetor (CALEGARIO et al., 2008; KITAJIMA et al., 2008a).

A mancha anular do cafeeiro (CoRSV) foi relatada pela primeira vez no Brasil por Bitancourt (1938, 1939). Esta doença é do tipo nuclear e acha-se descrito nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Distrito Federal. Usualmente é de pouca importância econômica, porém em casos esporádicos no sul de Minas e Triângulo Mineiro foram observadas altas incidências com desfolha intensa, queda na produção e prejuízos na qualidade da bebida (CHAGAS et al., 2003; BOARI et al., 2003a). A gravidade da doença provavelmente foi causada devido ao aumento das áreas de cultivo do café juntamente com distúrbios ecológicos, que podem ter sido causados devido o uso de produtos químicos no controle de pragas, favorecendo o vetor, ou devido a uma provável mutação do vírus (FIGUEIRA et al., 1995).

CoRSV atinge plantas de café causando sintomas principalmente nas folhas e frutos, ocorrendo com menos freqüência no caule. Nas folhas, os sintomas se apresentam como pequenas manchas cloróticas que gradualmente aumentam de tamanho, geralmente tomando a forma de um anel amarronzado, ás vezes com um centro necrótico. Em folhas senescentes, áreas com manchas anelares podem continuar verdes ou amarronzadas, rodeadas por áreas amarelas. Nos frutos as manchas ocorrem na forma de anéis irregulares, principalmente na região do pedúnculo, podendo causar lesões que promovem a queda das folhas e dos frutos (CHAGAS, 1988; CHAGAS et al., 2003).

Em condições de campo e casa de vegetação o vírus da mancha anular do cafeeiro apresenta somente como sintomas lesões locais tanto nas plantas hospedeiras como nas plantas indicadoras. Porém, Boari et al. (2003) observaram que, se plantas de *Chenopodium quinoa* inoculadas com o vírus forem submetidas a temperaturas em torno de 29-32 ºC por cerca de duas semanas, estas passam a apresentar clareamento de nervuras em folhas não inoculadas, demonstrando que esse vírus tem a capacidade de infectar a planta de modo sistêmico.

Este vírus se apresenta na forma de partículas curtas e baciliformes com 35-40 nm x 100-110 nm, detectado principalmente no parênquima lacunoso das células infectadas, localizadas

dentro das cisternas do retículo endoplasmático e no espaço perinuclear do núcleo das células infectadas (CHAGAS, 1980). Essas partículas tendem a ocorrer associada a um envelope nuclear ou membranas do retículo endoplasmático, dispostos perpendicularmente como se estivessem envolvidos em um processo de brotamento que raramente se completa (CHAGAS et al., 2003). Não ocorre a transmissão transovariana do CoRSV dentro do ácaro (CHAGAS, 1978). Recentemente o vírus foi purificado dispondo-se de anti-soro (BOARI et al., 2004) e parte do seu genoma encontra-se seqüenciado (LOCALI et al., 2005a). Um isolado distinto do CoRSV foi recentemente constatado em amostras coletadas na cidade de São Paulo, SP, e que se caracteriza por causar lesões de aspecto ferruginoso e as presumíveis partículas virais ocorrem consistentemente no lúmen do retículo endoplasmático. *Primers* que amplificam CoRSV não amplificam este isolado que foi designado de CoRSV-SP (CHAGAS et al., 2007).

O vírus da mancha das orquídeas (Orchid fleck vírus - OFV) foi encontrado pela primeira vez no Japão em plantas de *Cymbidium* que apresentavam sintomas de manchas cloróticas ou necróticas (DOI et al., 1977). Posteriormente este vírus foi relatado na Austrália, Brasil, Dinamarca, Alemanha, Coréia e Estados Unidos, como cita Kubo (2006). Caracteriza-se como um vírus do tipo nuclear e ocorre frequentemente em orquidários comerciais e particulares, afetando grande número de gêneros.

Sua importância é cosmética, devido às lesões que se apresentam na forma de manchas ou anéis cloróticos/necróticos nas folhas, sendo que não há registro de danos nas flores. O controle do ácaro elimina facilmente a virose.

Um grupo japonês demonstrou sua transmissão por *B. californicus* (MAEDA et al., 1998) sendo que no Brasil também se constatou que *B. californicus* é o vetor (FERREIRA et al., 2003). A variabilidade genética foi observada através da análise da seqüência de parte do genoma e por SSCP (KUBO et al., 2006). Kondo et al. (2003) seqüenciou o genoma do OFV, que consiste em duas moléculas de 6.431 (RNA 1) e 6.001 nucleotídeos (RNA 2). Embora algumas proteínas codificadas de OFV apresentem seqüência similares aos rabdovirus de plantas, OFV difere destes vírus devido ao fato de possuir um genoma bipartido. Uma constatação importante feita no Brasil é que, em alguns casos, sintomas típicos de OFV eram causados por vírus do tipo citoplasmático, que poderia ser referido como OFV-C (FREITAS-ASTUA et al., 1999).

OFV são vírus não-envelopados que se apresentam na forma baciliforme, com cerca de 100-150 nm de comprimento e 32-40 nm de largura, podendo também apresentar estruturas

helicoidais (CHANG et al., 1976). Em células de orquídea infectadas o OFV induz inclusões celulares do tipo viroplasma, elétron transparente (KONDO et al., 2003). Kondo et al. (1995) produziu o anti-soro a partir do OFV purificado.

A mancha verde do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) foi descrita pela primeira vez na região de Vera Cruz, SP, onde pequenos produtores cultivavam esta fruteira em substituição ao cafeeiro. A doença também foi encontrada nos estados da Bahia, Sergipe, Rondônia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e no Distrito Federal (KITAJIMA et al., 2003a).

O nome da doença é derivado de manchas verdes que possuem 2-5 mm de diâmetro e desenvolvem-se em frutos amarelos. Essas manchas podem ser uniformemente verdes ou com uma depressão necrótica central. Esta condição aparentemente não altera a qualidade dos frutos, porém as manchas diminuem seu valor de mercado. As manchas podem ocorrer em folhas senescentes, cloróticas ou ao longo das nervuras. Lesões necróticas no caule são freqüentemente observadas. Acompanhado de infestação pesada pelo ácaro *B. phoenicis,* lesões dos ramos podem se fundir, resultando no anelamento e morte das plantas e, eventualmente, a destruição de todo o pomar (KITAJIMA et al., 1997, 2003b).

A teoria para a etiologia viral da mancha verde do maracujá foi investigada através de exames de secções finas de frutos, folhas e caules que apresentavam lesões. Partículas baciliformes curtas (50-70 nm x 100-120 nm) limitadas por membrana foram consistentemente encontradas no lúmen do retículo endoplasmático em todas as amostras examinadas (KITAJIMA et al., 1997). Antonioli-Luizon et al. (2008) logrou obter parte do genoma deste vírus e produziu *primers* que amplificam através de RT-PCR fragmentos de DNA em material infectado.

2.1.4 Mancha clorótica de *Clerodendrum*

Manchas cloróticas/necróticas em folhas de coração-sangrento foram observadas pela primeira vez em um jardim de Piracicaba, SP, associadas à infestação com *B. phoenicis*. As lesões foliares foram reproduzidas após transferência de ácaros de plantas afetadas para sadias e exames de secções de tecidos das lesões foliares ao microscópio eletrônico revelaram ocorrência de efeitos citopáticos do tipo nuclear (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2003a) e concluiu-se que os sintomas eram causados por um VTB, o qual foi designado de mancha clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* chlorotic spot virus- ClCSV). Este vírus é transmitido

mecanicamente de coração-sangrento para coração-sangrento tanto mecanicamente como por ácaros, para várias outras plantas. Verificou-se também a disseminação natural do vírus de coração-sangrento para outras espécies (KITAJIMA et al., 2005b). Em *Chenopodium quinoa* Will. e *C. amaranticolor* Coste & Reyn. ClCSV os sintomas são lesões locais cloróticas e caso as plantas forem mantidas por cerca de 2 semanas entre 28-30 ^{o}C, ocorre infecção sistêmica, caracterizada pelo clareamento das nervuras e pelas manchas cloróticas generalizadas (ALCÂNTARA et al., 2005). BOARI et al. (2006) obteve a purificação parcial do vírus.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, fonte de inóculo e manutenção

Para inóculo inicial, foram utilizadas plantas de coração-sangrento (*Clerodendrum x speciosum*) que apresentavam manchas cloróticas e necróticas associadas à infestação com *Brevipalpus phoenics*, observadas em um jardim em Piracicaba, SP. Posteriormente, plantas inoculadas pelo ClCSV (*Clerodendrum* chlorotic spot vírus- ClCSV) através de ácaros virulíferos e transmissão mecânica foram mantidas em condições de casa-de-vegetação As plantas inoculadas apresentaram sintomas semelhantes às plantas de coração-sangrento inicialmente observadas. Estas plantas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação, sendo utilizada como fonte de inóculo para os experimentos posteriores.

Para a multiplicação do vírus utilizaram-se as plantas-testes *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. e *Chenopodium quinoa* Willd., que após a transmissão mecânica do vírus foram mantidas nas primeiras duas semanas a 28-30ºC para a indução de infecção sistêmica (ALCÂNTARA et al., 2005). Essas plantas foram utilizadas como fonte de inóculo na purificação do vírus, ensaios de transmissão mecânica, caracterização molecular e biológica.

Os extratos de folhas de plantas de coração-sangrento *Clerodendrum x speciosum* foram obtidos através de trituração em um almofariz juntamente com o tampão contendo fosfato 0,01 M pH 7, nicotina (2% v/v) e carvão ativado (0,03% w/v), sendo necessário devido ao fato da planta ser rica em tanino (CHAGAS, 1978). A concentração utilizada foi de aproximadamente 2 g de tecido com lesão para 10 ml de tampão. As folhas inoculadas foram polvilhadas com o abrasivo *carborundum* e o extrato aplicado através de fricção manual.

Para as transmissões mecânicas que visavam à infecção sistêmica, folhas infectadas das hospedeiras *C. amaranticolor* e *C. quinoa* foram utilizadas. As folhas foram maceradas na presença de tampão fosfato 0,01 M, pH 7, com 0,1% de sulfito de sódio.

3.2 Purificação do vírus

A purificação do ClCSV foi realizada segundo o protocolo utilizado na purificação do *Cofee ringspot vírus* - CoRSV (BOARI et al., 2004) e do Orchid fleck virus - OFV (CHANG et al.,

1976), com pequenas alterações.

Foram utilizados tecidos foliares infectados de *C. amaranticolor* e C. *quinoa* que apresentavam sintomas de infecção sistêmica e estavam armazenados em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados na presença de tampão fosfato 0,01 M, pH 7. O extrato foi filtrado em gaze, acrescentando-se 0,1 % de ácido tioglicólico e centrifugado a 11.000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante agregou-se 2% de Triton X 100, e após 15 minutos de agitação, acrescentou-se 6% PEG 6.000. O conteúdo sofreu agitação por 1 hora, seguida de centrifugação a 9.000 g por 20 minutos. O sedimento foi ressuspenso com tampão fosfato 0,01 M, pH 7, centrifugado a 11.000g por 10 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 1% de Triton X 100 e submeteu-se a agitação por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se em colchão de sacarose 30% a 85.000 g por 1 hora. O precipitado foi ressuspenso em 5 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 7 e centrifugado a 11.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado em gradiente de densidade de sacarose de 10-40% a 87.000g por 1 hora e formaram-se duas bandas visíveis. A banda inferior foi coletada com uma seringa e diluída com tampão fosfato 0,01 M, pH 7, centrifugada a 50.000 g por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi diluído em tampão fosfato 0,01 M, pH 7 e posteriormente, a solução foi centrifugada a 11.000 g por 10 minutos.

3.3 Identificação do vírus utilizando a técnica PTA – ELISA

A detecção de infecção viral foi realizada através do teste sorológico ELISA (“Enzime Linked Imunnosorbent Assay”) do tipo Plate Trapped Antigen (PTA) (Mowat e Dawson, 1987). Utilizou-se o antissoro produzido a partir do ClCSV purificado, na concentração de 20 µg/mL (KITAJIMA et al., 2008b). O antissoro específico foi cedido gentilmente por Karen Kubo.

Amostras de tecidos de *Clerodendrum x speciosum, Hibiscus schizopetalus, Salvia leucantha, Malvaviscus arboreus e Annona muricata* sadios e apresentando sintomas de ClCSV, *Coffea arábica* sadios e apresentando sintomas de CoRSV *e Oncidum* sadios e apresentando sintomas de OFV foram macerados, individualmente, com o auxílio de nitrogênio líquido, na presença de tampão carbonato de cálcio pH 9,6 na diluição 1:50. Aplicou-se 100 µL de cada amostra em cada pocinho na placa de ELISA, utilizando-se dois pocinhos para cada amostra. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura de 37°C, em seguida lavou-se a placa

três vezes com PBS-Tween 0,0015 M KH_2PO_4, 0,14 M NaCl, 0,004 M NaH_2PO_4, 0,003 M KCl pH 7,4 e 0,5 mL Tween 20/L .Aplicou-se então 100 µL de antissoro específico para ClCSV, diluído em 1:1000 em PBS – TPB 0,2% Bovine Serum Albumin nos pocinhos, incubou-se por 2 horas a 37°C e a placa foi lavada três vezes consecutivas com PBS-Tween. Aplicou-se então em cada pocinho 100 µL de imunoglobulina IgG conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA), diluída de acordo com a recomendação do fabricante em PBS-TPB. As amostras foram incubadas novamente por 2 horas a 37°C, lavou-se a placa três vezes consecutivas com PBS-Tween e aplicou-se em cada pocinho 100 µL de ρ-fosfato de nitrofenil SIGMA diluído em dietanolamina 0,6mg/mL. A placa foi mantida em temperatura ambiente no escuro por 30-60 minutos. Ao final foi feita a leitura da absorbância de cada um dos pocinhos utilizados através do leitor de ELISA Metertech 960. A reação foi avaliada através de um filtro de 405 nm. O resultado foi considerado positivo quando o valor médio da absorbância das amostras excedeu em duas vezes quando comparado ao valor médio da absorbância do extrato da planta sadia.

3.4 Caracterização molecular do ClCSV

3.4.1 Obtenção do cDNA utilizando RT-PCR

Utilizaram-se amostras de folhas de *Clerodendrum x speciosum*, *Chenopodium quinoa*, *Salvia leucantha*, *Hibiscus schizopetalus*, *Malvaviscus arboreus* e *Annona muricata* com ClCSV, *Coffea arabica* com CoRSV e *Oncidum* sp. com OFV para a realização da RT-PCR. Folhas das mesmas espécies vegetais sadias foram utilizadas em todos os testes como controles.

Para a extração do RNA total, utilizou-se o protocolo modificado de Gibbs & Mackenzie (1997). Foram utilizados aproximadamente 50 a 100 mg de material fresco macerados na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, adicionou-se então 500 µL do tampão WB (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05% BSA). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas através do vortex e centrifugadas a 13.400g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 600 µL do tampão CTAB (2% de CTAB; 1,4 M NaCl; 0,01M Tris-HCl pH 8; 0,5% β-mercaptoetanol) e o conteúdo foi homogeneizado no vortex. A amostra foi incubada por 15 minutos a 55ºC, adicionou-se 400 µL de clorofórmio:

álcool isoamílico (24:1) e utilizou-se o vortex para homogeneizar a solução. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.400 g durante 10 minutos e a fase aquosa foi transportada para um novo microtubo, ao qual se adicionou um décimo do volume de acetato de amônio 7,5 M e um volume de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a -20°C por 5-10 minutos e centrifugadas a 13.400 g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido cuidadosamente para a manutenção do "pellet". Ao precipitado foi adicionado 1 mL de álcool etílico e centrifugado por 13.400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi desidratado no liofilizador para ressuspende-lo adicionou-se 20 µL de água tratada com DEPC. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Para a síntese do cDNA, inicialmente utilizou-se uma alíquota do 3 µL do RNA extraído anteriormente, 1 µL de dNTP 2,5 mM, 1 µL de *primers* randômicos (3 ug/uL) (Invitrogen) e 7,5 µL de água DEPC, que foram submetidos a temperatura de 70 ºC por 5 minutos e colocados imediatamente no gelo. A este conteúdo foi adicionado 0,5 µL de RNAse OUT (Invitrogen), 2 µL de DTT (0,1M), 1 µL de M-MLV-RT (200 U/uL) e 4 µL de tampão 5x (Invitrogen). Esta reação foi submetida a temperatura de 37 ºC durante 1 hora. Para a PCR utilizou-se uma alíquota de 3 µL de cDNA, 2,5 µL de tampão 10x, 0,9 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µL de dNTP 2,5 mM, 0,5 µL dos *primers* ClCSV PL-R e -F (10mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ uL) (Invitrogen) e água DEPC para atingir o volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf) ou PTC-100 (MJ Research, Inc.), programado com 1 ciclo de 94ºC por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 58ºC por 35 segundos e 72ºC por 40 segundos, com um ciclo final de 72ºC por 5 minutos. As mesmas condições foram utilizadas para os primers CoRSV-R e –F, sendo a única diferença entre elas a temperatura de anelamento de 56ºC. Para os primers OFV-R e -F o termociclador foi programado com 1 ciclo de 94ºC por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94ºC por 30 segundos, 58ºC por 40 segundos e 72ºC por 40 segundos, com um ciclo final de 72ºC por 10 minutos.

Os *primers* ClCSV PL-R e PL–F foram desenhados com base nas seqüência de nucleotídeos obtidas a partir de fragmentos que codificam a polimerase do vírus (Kubo, Freitas-Astúa e Kitajima, dados não publicados). Os *primers* foram gentilmente cedidos pela doutoranda Karen Kubo, do Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC. Para a detecção do CoRSV, foram utilizados *primers* gentilmente cedidos pela Dra. Eliane Locali-Fabris, do Centro APTA Citros

Sylvio Moreira-IAC (dados não publicados) e para a detecção do OFV foram utilizados *primers* gentilmente cedidos pela doutoranda Karen Kubo.

Os resultados das amplificações foram avaliados através de eletroforese em géis de agarose 1% (TAE 1X) contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

3.4.2 Seqüenciamento a partir do produto de PCR

3.4.2.1 Clonagem dos produtos de PCR

Utilizaram-se diretamente os fragmentos amplificados obtidos da PCR realizada com amostras infectadas com ClCSV, CoRSV e OFV para a ligação com o vetor de clonagem Clone Jet PCR Cloning kit (Fermentas), na proporção de 1 µL do amplicon, 5 µL de tampão 2x, 0,5 µL de DNA Bl e 2,5 µL de água do próprio kit. A reação foi submetida à temperatura de 70 ºC por 5 minutos e em seguida colocada no gelo. O plasmídeo foi então inserido em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α através de transformação por choque térmico (Sambrook et al., 1989). Dessa forma, 5 µL da reação de ligação foram inseridos em 50 µL de células competentes, mantidos em gelo por 1 hora, transferidos para o banho-maria a 42ºC por 90 segundos e colocados no gelo imediatamente depois por 2 minutos, sob câmara de fluxo laminar. Em todos os tudo foram adicionados 500 µL de meio SOC (10g de bacto triptona, 5g de extrato de levedura, 0,585g de NaCl, 186 mg de KCl, 10 mL de glicose 2M, água Milli-Q estéril para 1 L). As células foram mantidas em agitador a 37º C e agitação de 250 rpm por 1 hora e 30 minutos para reestruturação das células competentes.

Sobre o meio de cultura LB sólido com ampicilina (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl, 7,5 g/L ágar bacteriológico, 100 µg/mL ampicilina) adicionaram-se 100 µL de cultura de células por placa e estas foram colocadas em estufa a 37º C por 16 horas.

3.4.2.2 Seleção e estoque de clones positivos

As colônias foram escolhidas levando em consideração características como tamanho e agrupamento. Os clones foram coletados com o auxilio de palitos esterilizados e transferidos para microplacas de 96 poços, contendo 100 µL de meio Circle Grow contendo ampicilina (50 µg/mL). A microplaca foi mantida por 22 horas a 37°C em estufa para a sua multiplicação. Em

cada poço adicionaram-se 100 µL de glicerol 40% para a conservação das culturas permanentes e a microplaca foi armazenada em freezer -80°C. As culturas foram repicadas em placas de crescimento ("Mega Titer") contendo 1 mL de meio CG com ampicilina (50 µg/mL) e em seguida foram seladas com um filme adesivo com uma abertura em cada poço para a aeração das bactérias. Para o crescimento dos clones a placa foi submetida à agitação de 300 rpm no agitador a 37°C durante 16 horas.

3.4.2.3 Extração do DNA plasmidial

Para a extração dos plamídeos foi utilizada a metodologia adaptada Boiling Prep. As placas de crescimento foram centrifugadas por 6 minutos a 3.000 rpm para a sedimentação das células, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente por 1 minuto.

A placa foi mantida no freezer -80°C por 15 minutos e transferida para estufa a 37°C por 10 minutos. Acrescentaram-se 25µL de água MilliQ autoclavada, seguida de homogeneização utilizando o vortex por 5 minutos. A suspensão foi adicionada 70 µL da solução de lise (STET-Tween 20) e a placa foi novamente homogeneizada utilizando-se o vortex por 1 minuto. A placa foi mantida em gelo por 15 minutos, centrifugada por 40 minutos a 3.000 rpm e 50 µL do conteúdo foram transferidos para uma nova placa.

A placa foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada por 40 minutos a 3.000 rpm. O DNA extraído em volume aproximado de 50 µL foi transferido para uma nova placa.

3.4.2.4 Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o "DNA Sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction", v.3.0 (Perking Elmer) conforme instruções do fabricante. Para a reação foram utilizados 2 µL do DNA, 2 µL do tampão "Save Money" (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM $MgCl_2$), 0,5 µL do *primer* T7 do vetor de clonagem (5 pmols), 0,4 µL de Big Dye e 5,1 µL de H_2O Milli-Q estéril. A reação foi centrifugada por alguns segundos e colocada no termociclador (Eppendorf - Mastercycle Gradient) com o programa consistindo de 1 ciclo de 96°C por 2 minutos, seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C de 5 segundos e 60°C por 4 minutos com o ciclo final de 4°C.

A precipitação foi realizada com 80 µL de isopropanol 65% a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo em seguida centrifugada a 3.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi

descartado e a placa foi seca em papel absorvente antes da adição de 200 µL de etanol 60%. Foi realizada outra centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, seguida de nova lavagem com etanol 60%. O sobrenadante foi descartado, e o "pellet" seco em temperatura ambiente.

3.4.2.5 Confirmação das seqüências dos amplicons

A qualidade das seqüência geradas foi verificada através dos eletroferogramas analisados pelo programa "Phred –Phap-Consed".

O alinhamento das seqüência foi verificado através do programa "CAP 3". As regiões correspondentes aos adaptadores e aos vetores empregados na clonagem foram removidas das seqüência. Foram obtidas seqüências consenso, os "contigs" através do alinhamento das seqüência formadas e submetidas à consulta de similaridade com outras seqüência já depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) através do endereço http//www.ncbi.nlm.nih.gov. A ferramenta utilizada para essa consulta foi o BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool), sendo que foram considerados apenas alinhamentos entre seqüência nucleotídicas que obtiveram "e-value" inferior a 10^{-10}.

3.5 Microscopia de Luz

Para a realização das análises morfo-anatômicas dos tecidos de *Clerodendrum x speciosum, Hibiscus schizopetalus., Salvia leucantha, Malvaviscus arboreus e Annona muricata* utilizaram-se amostras de folhas sadias e contendo lesões coletadas em jardins do parque do *campus* da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. A presença do ClCSV nestas amostras foi confirmada paralelamente por RT-PCR.. Os sintomas foliares foram registrados digitalmente e a seguir, fragmentos das lesões cortadas foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica e infiltradas em hidroxi-etil-metacrilato (Leica Historesin) e os blocos obtidos foram seccionados a 5 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As secções foram montadas em lâminas de vidro e posteriormente coradas com azul de Toluidina

(SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais, cloreto férrico para verificar compostos de natureza fenólica (JOHANSEN, 1940), cloreto de zinco iodado para detectar amido (JENSEN, 1962), Sudan IV para a identificação de corpos lipídicos (JOHANSEN, 1940), vermelho de rutênio para a detecção de compostos de natureza péctica ((JOHANSEN, 1940) e Xylidine Ponceau para detecção de compostos protéicos (CORTELAZZO, 2007). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética “Entellan” e as imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação mecânica e manutenção do inóculo

Nos ensaios de transmissão mecânica, as plantas-teste *C. amaranticolor* e *C. quinoa* foram infectadas e apresentaram lesões locais cloróticas uma semana após a inoculação com o extrato de *C. x speciosum* exibindo sintomas de manchas cloróticas/necróticas (Figura 1). A transmissão mecânica obteve sucesso quando se utilizou o tampão com nicotina e carvão ativado, porém, quando se utilizou o tampão fosfato convencional, a transmissão não ocorreu.

Contudo, a partir de lesões em *Chenopodium* spp se obteve a infecção nestas mesmas espécies, sem dificuldades, extraindo-se o vírus com o tampão fosfato convencional. Notou-se também que como ocorre com OFV (KONDO et al., 1995) e CoRSV (BOARI et al., 2003), dois VTBs do tipo nuclear, se as plantas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* são submetidas a temperaturas de 28ºC a 30ºC por cerca de duas semanas, ocorre uma infecção sistêmica caracterizada por manchas cloróticas e clorose das nervuras (KITAJIMA et al., 2008b) (Fig. 2).

Figura 1 - *Chenopodium quinoa* apresentando manchas cloróticas locais (setas) devido à inoculação mecânica do ClCSV a partir de plantas de *Clerodendrum*

Figura 2 - C*henopodium quinoa* apresentando infecção sistêmica, caracterizada por manchas cloróticas e nervuras mais claras

4.2 Purificação do vírus

A purificação foi realizada a partir de folhas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa* infectadas sistemicamente, nas quais exames de secções ao microscópio eletrônico revelavam alta concentração de presumíveis partículas virais. Para tal, utilizou-se o mesmo protocolo descrito para a purificação do vírus da mancha anular do cafeeiro (Cofee ringspot vírus – CoRSV) (BOARI et al., 2004), o qual foi baseado nos procedimentos utilizados na purificação do Orchid fleck virus - OFV (CHANG et al., 1976), com pequenas alterações.

A ultra centrifugação em gradiente de densidade de sacarose gerou uma banda visível a cerca de 1/3 do fundo do tubo. Esta fração quando examinada ao microscópio eletrônico de transmissão revelou constituir-se de partículas em forma de bastonetes com cerca de 40 nm de diâmetro, com uma das extremidades arredondada e cerca de 100 nm de comprimento e em magnificações maiores notam-se claramente estriações transversais de cerca de 4 nm de espaçamento (KITAJIMA et al., 2008b) (Fig. 3). Esta morfologia das partículas que compõe a preparação purificada é essencialmente similar àquela descrita para os vírus do OFV (KONDO et al., 1995) e CoRSV (BOARI et al., 2006);

Foram realizadas inoculações mecânicas com o purificado de ClCSV em *C. quinoa*, resultando no aparecimento de lesões típicas deste vírus, confirmando a infectividade do purificado e a natureza viral das partículas em forma de bastonetes visualizadas.. O purificado de ClCSV obtido foi utilizado nas transmissões mecânicas, ensaios sorológicos e caracterização molecular.

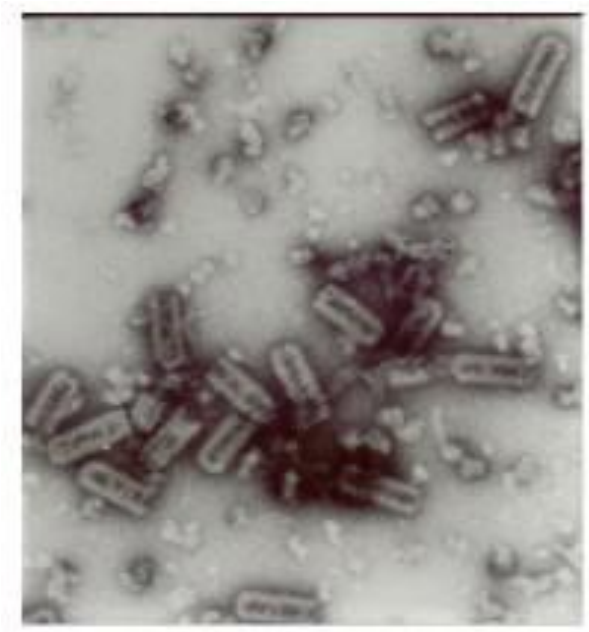

Figura 3 -Micrografia eletrônica de transmissão mostrando partículas em forma de bastonetes com uma extremidade arredondada e exibindo estriações transversais presentes em preparação purificada e infectiva, obtida a partir de *C. quinoa* e *C. amaraticolor* infetadas sistemicamente pelo vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* (ClCSV), contrastada negativamente com acetato de uranila

4.3 Identificação sorológica do vírus por PTA-ELISA

O anticorpo gerado a partir da preparação purificada do ClCSV mostrou-se eficiente e específico para a detecção deste vírus em amostras de plantas infectadas experimentalmente ou naturalmente. A Figura 4 ilustra um dos experimentos em que se utilizou uma planta de *C. x speciosum* infectada experimentalmente e outras que cresciam junto a *C. x speciosum* exibindo sintomas de manchas cloróticas ou anulares, presumivelmente infectadas naturalmente pelo ClCSV, pois exames de secções das lesões foliares revelaram a presença de efeito citopático do tipo nuclear dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB-N). Deve-se mencionar que estes sintomas foram reproduzidos em ensaios de transmissão experimental com ácaros *B. phoenicis* (KITAJIMA et al., 2008b). Nestes ensaios as leituras sempre foram acima do dobro da absorbância registrada para os tecidos sadios, exceto no caso da gravioleira. Nesta a leitura do extrato das lesões foi pouco menor que o dobro da absorbância do tecido sadio. É possível que pela natureza arbórea, compostos como tanino, polifenóis e alcalóides possam ter interferido na reação. Na Fig.4 acham-se incluídos resultados de outro experimento utilizando extratos de orquídea, infectado pelo OFV e cafeeiro, pelo CoRSV, dois outros VTB-N. Com o OFV não

ocorreu reação, mas com CoRSV houve uma ligeiro aumento na absorbância (Fig. 4), indicando que esses vírus podem compartilhar alguns epitopos, como observado também em ensaios de imunolocalização *in situ* (E.W. Kitajima, dados não publicados).

Esses resultados sugerem que, apesar do ClCSV, OFV e CoRSV serem pertencentes ao grupo dos VTBs do tipo nuclear, provavelmente representem espécies distintas. Um novo gênero *Dichorhabdovirus*, foi proposto para OFV (Kondo et al., 2006), do qual CoRSV e ClCSV seriam possíveis membros (KITAJIMA et al., 2008b).

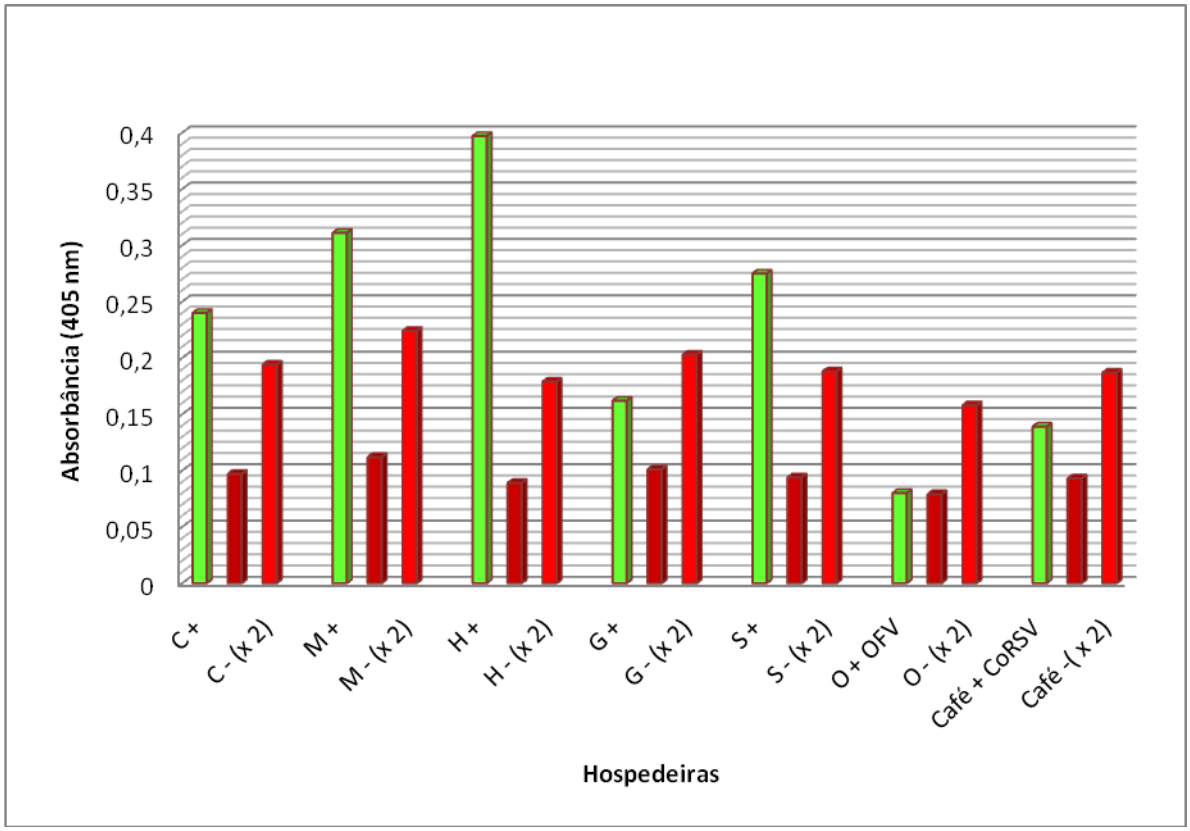

Figura 4 - Resultado do ensaio de PTA-ELISA com anti-soro produzido a partir de preparação purificada do vírus da mancha clorótica do *Clerodendrum* (ClCSV) usando-se extratos de plantas infectadas pelo ClCSV (*Clerodendrum x speciosum* (C), *Malvavisco arboreus* (M), *Hibiscus rosa-sinensis* (H), *Annona muricata* (G) e *Salvia leucanta* (S) e extratos de *Cymbidium sp.* infectado pelo Orchid fleck vírus (OFV) e cafeeiro infectado pelo vírus da mancha anular do cafeeiro (CoRSV) além dos extratos das respectivas plantas sadias

4.4 Caracterização molecular

4.4.1 Amplificação por RT-PCR

Apenas as amostras infectadas com ClCSV, e não as sadias correspondentes apresentaram banda única específica de 219 pb em gel de agarose após a amplificação por RT-PCR utilizando-se os primers ClCSV PL-F e R. Amostras de café com CoRSV e orquídea com OFV não foram amplificadas com esses primers, evidenciando a especificidade dos mesmos (Figura 5).

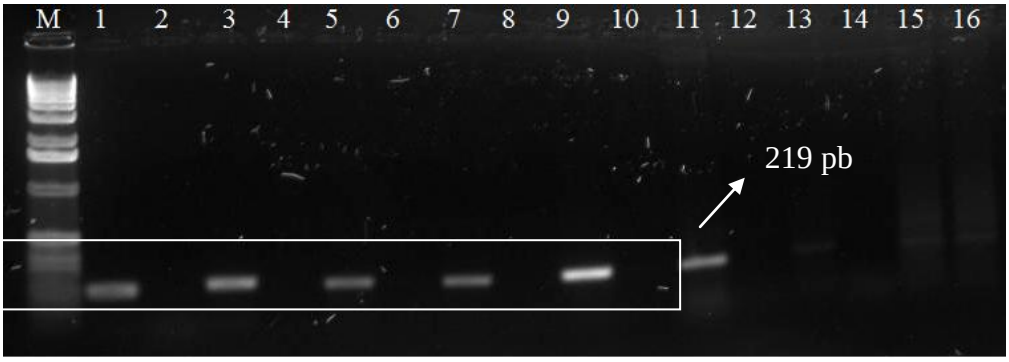

Figura 5: Gel de agarose 1% evidenciando o resultado de RT-PCR utilizando primers específicos para *Clerodendron* chlorotic spot virus (ClCSV). M : Marcador molecular 1 Kb DNA Extension Ladder (Invitrogen); 1: *Clerodendron x speciosum* infectado; 2: *C.speciosum* sadio; 3: *Chenopodium quinoa* infectado; 4: *C. quinoa* sadio; 5: *Hibiscus schizopetalus* infectado; 6: *H. schizopetalus* sadio; 7: *Malvaviscus arboreus* infectado; 8: *M. arboreus* sadio; 9: *Salvia leucantha* infectada; 10: *S. leucantha* sadia.; 11: *Annona muricata* infectada; 12: *A. muricata* sadia; 13: *Coffea arabica* infectado com CoRSV; 14: *C. arabica* sadio; 15: *Oncidum* sp. infectado com OFV; 16: *Oncidium* sp.sadio

Nas reações utilizando-se os primers específicos para a amplificação de região do OFV e do CoRSV, apenas amostras contendo o vírus homólogo apresentaram bandas específicas em gel de agarose, não tendo sido possível detectar o ClCSV em nenhuma das amostras testadas (Figuras 6 e 7).

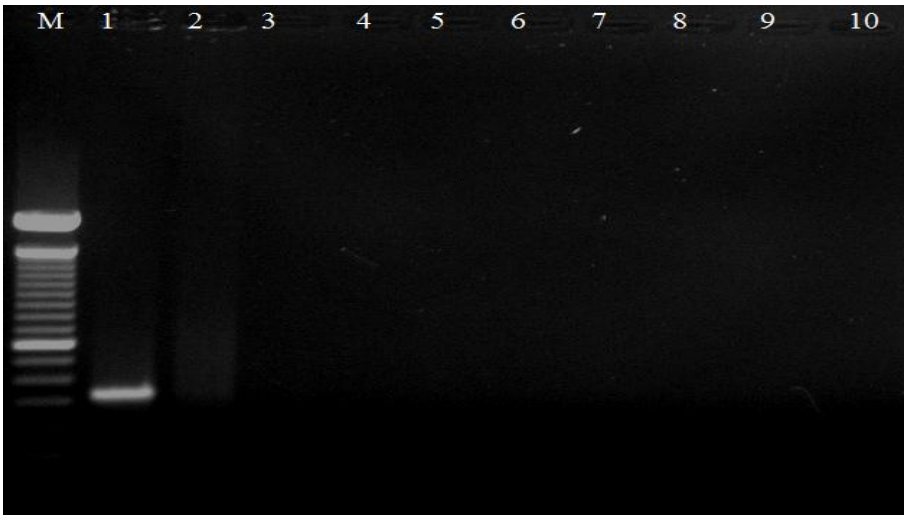

Figura 6: Gel de agarose 1% evidenciando o resultado de RT-PCR utilizando primers específicos para Orchid Fleck Vírus (OFV). M : Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); 1: *Oncidium* sp. infectado com OFV; 2: *Oncidium* sp. sadio; 3: *Clerodendron x speciosum* infectado com ClCSV; 4: *Clerodendron x speciosum* sadio; 5: *Hibiscus schizopetalus* infectado com ClCSV; 6: *Hibiscus schizopetalus* sadio; 7: *Malvaviscus arboreus* infectado com ClCSV; 8: *Malvaviscus arboreus* sadio; 9: *Salvia leucantha* infectado com ClCSV; 10: *Salvia leucantha* sadio

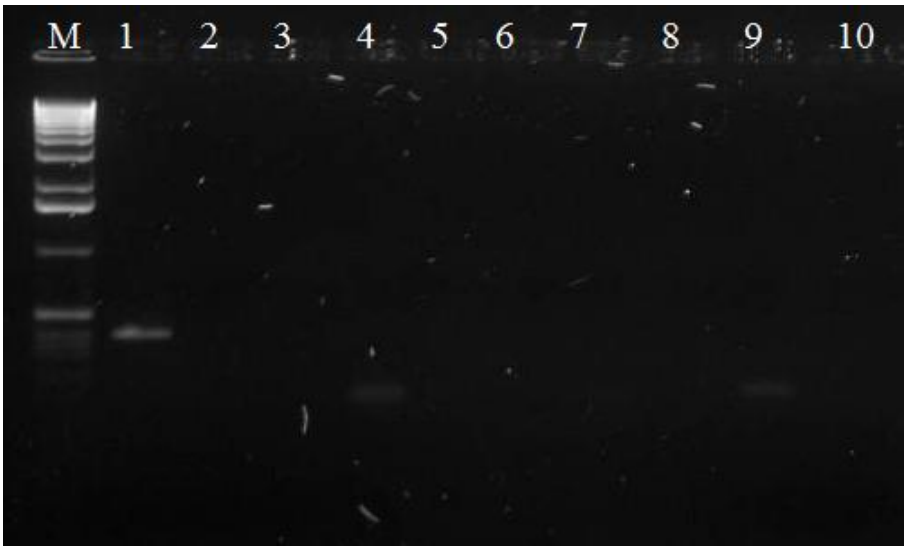

Figura 7: Gel de agarose 1% evidenciando o resultado de RT-PCR utilizando primers específicos para Coffee ringspot virus (CoRSV). M : Marcador molecular 1Kbp DNA extension Ladder (Invitrogen); 1: *Coffea arábica* infectada com CoRSV; 2: *Coffea arábica* sadio; 3: *Clelrodendrum x speciosum* infectado com ClCSV; 4: *Clerodendron x speciosum* sadio; 5: *Hibiscus schizopetalus* infectado com ClCSV; 6: *Hibiscus schizopetalus* sadio; 7: *Malvaviscus arboreus* infectado com ClCSV; 8: *Malvaviscus arboreus* sadio; 9: *Salvia leucantha* infectado com ClCSV; 10: *Salvia leucantha*

Os resultados indicam que os primers desenhados com base em parte da região codificadora da polimerase do ClCSV são específicos para o vírus, já que não ocorreu a amplificação de amostras infectadas com OFV e CoRSV. A mesma especificidade foi

observada para os primers desenhados a partir de regiões do OFV e do CoRSV, sugerindo que, apesar de ClCSV, OFV e CoRSV serem vírus do tipo nuclear transmitidos por ácaros *Brevipalpus*, eles devem mesmo constituir espécies distintas de vírus.

4.4.2 Seqüenciamento a partir do produto de PCR

A partir do seqüenciamento dos fragmentos obtidos de PCR de amostras infectadas com ClCSV e CoRSV, foram obtidas seqüência de nucleotídeos que foram analisadas e comparadas com aquelas disponíveis no GenBank. Para isso utilizou-se a função BLASTx, que fornece as seqüência de aminoácidos deduzidos similares àquelas de nucleotídeos consultadas.

Através do alinhamento das seqüência formadas correspondentes ao ClCSV, seis "contigs" foram obtidos. Um dos contigs formados era constituído somente por 32 amostras de *Clerodendrum* e os demais contigs eram constituídos pelas demais hospedeiras. Este fato demonstra que o vírus pode apresentar pequenas variações conforme a hospedeira. Todos os "contigs" ao serem comparados através da função BLASTx apresentaram similaridade com a polimerase de OFV, onde a maior identidade de nucleotídeos encontrada foi de 65%.

Obtiveram-se também seqüências de nucleotídeos a partir do produto de PCR de amostras infectadas com CoRSV. Através do alinhamento das seqüência formadas foram obtidos dois "contigs", que ao serem comparados através da função BLASTx também apresentaram o valor de 65% de identidade com a polimerase de OFV.

Considerando-se o fato da identidade ser o valor em porcentagem do número de acertos em relação ao tamanho total do alinhamento, podemos considerar os valores de identidade obtidos como satisfatórios, já que se este valor fosse muito próximo a 100% deveríamos considerar a chance de contaminação do material utilizado pelo OFV.

Os resultados do seqüenciamento demonstram que, assim como os demais VTBs do tipo nuclear, o ClCSV e o CoRSV devem pertencer ao gênero Dichorhabdovirus, proposto recentemente para o OFV após o seqüenciamento completo de seu genoma (KONDO et al., 2006), devido aos valores de identidade obtidos. Entretanto, deve-se considerar também que os resultados da amplificação por RT-PCR demonstraram que, apesar de ClCSV, CoRSV e OFV possivelmente pertencerem a um gênero em comum, esses vírus devem constituir espécies

distintas, já que os primers utilizados para a detecção do ClCSV, OFV e CoRSV mostraram-se específicos.

4.5 Microscopia de luz e citopatologia

4.5.1 Análises anatômicas dos tecidos das hospedeiras

Folhas Sadias

A lâmina foliar das espécies *Clerodendrum x speciosum* (Figura 8A) *Annona muricata* (Figura 8C) *e Salvia leucantha* (Figura 8F) apresentam cutícula espessa ao contrário das espécies *Hibiscus schizopetalus* (Figura 8D) e *Malvaviscus arboreus* (Figura 8E) que as tem delgada. Todas as espécies apresentam folhas hipoestomática e mesofilo dorsiventral. Observa-se a presença de tricomas glandulares constituídos de poucas células nas espécies *C. x speciosum* (Figura 8A), *H. schizopetalus* (Figura 8D), *M. arboreus* (Figura 8E) *e S. leucantha* (Figura 8F). A espécie *C. x speciosum* além de tricomas glandulares, também apresenta tricomas tectores e ambos ocorrem na face abaxial da folha. Nas outras espécies, os tricomas ocorrem nas duas faces.

Nas espécies *C. x speciosum* (Figura 8A), *A.muricata* (Figura 8C), *M. arboreus* (Figura 8E) *e S. leucantha* (Figura 8F) o parênquima paliçádico é constituído por uma camada de células alongadas e ocasionalmente ocorre a segunda camada, sendo que na espécie *M. arboreus* (Figura 8E) ocorre a presença de conteúdo mucilagenoso.

O parênquima lacunoso das espécies *H. schizopetalus* (Figura 8D) e *M. arboreus* (Figura 8E) é constituído por três a cinco camadas de células, sendo que nessa espécie ocorre a presença de conteúdo mucilagenoso. Nas espécies *C. x speciosum* (Figura 8A) e *A. muricata* (Figura 8C) o parênquima lacunoso é constituído por cerca de seis camadas de células e em *S. leucantha* (Figura 8F) observa-se até oito camadas de células.

Todas as espécies apresentam feixe vascular colateral envolto por uma bainha de células parenquimáticas, sendo que em *H. schizopetalus* observa-se em algumas células a presença de cristais do tipo drusa. Nas espécies *C. x speciosum* (Figura 8A), *A. muricata* (Figura 8C) e *M. arboreus* (Figura 8E) a nervura central é revestida por epiderme uniestratificada, sendo que as células da epiderme da face adaxial são maiores do que as da face abaxial. Em *C. x speciosum* observa-se a presença de colênquima em ambas as faces e na região central ocorre o parênquima

fundamental, constituído por até oito camadas de células de diâmetro variáveis. Em *M. arboreus* observa-se a presença de idioblastos com conteúdo mucilagenoso e na região central ocorre o parênquima fundamental, constituído de células de diâmetro variáveis.

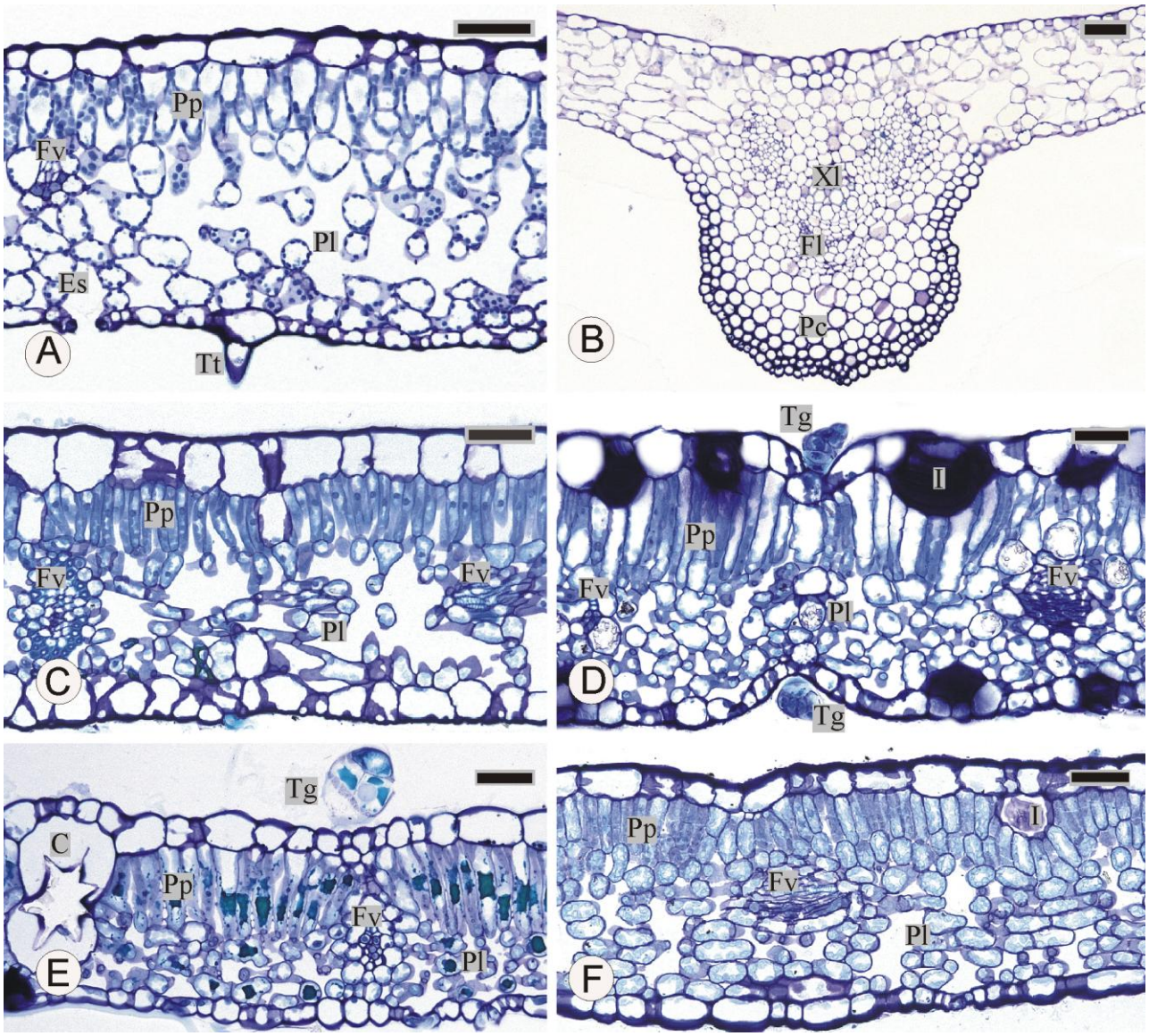

Figura 8: Cortes transversais de folhas sadias coradas com azul de toluidina. A. Lâmina foliar de *Clerodendron x speciosum*. B. Nervura central de *Clerodendron x speciosum*. C. Lâmina foliar de *Annona muricata*. D. Lâmina foliar de *Hibiscus schizopetalus*. E. Lâmina foliar de *Malvaviscus arboreus*. F. Lâmina foliar de *Salvia leucantha* (Barras 50 µm). C – Cristal; Es – Estômato; Fl – Floema; Fv – Feixe Vascular; I – Idioblasto; Pl – Parênquima Lacunoso; Pp – Parênquima Paliçádico; Tg – Tricoma Glandular; Tt – Tricoma Tector; Xl – Xilema.

Folhas infectadas pelo ClCSV

Para as análises anatômicas utilizaram-se tecidos de *Clerodendrum x speciosum, Annona Muricata,Hibiscus schizopetalus, Malvaviscus arboreus e Salvia leucantha* contendo lesões coletados em jardins do parque do campus da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP (Figura 9).

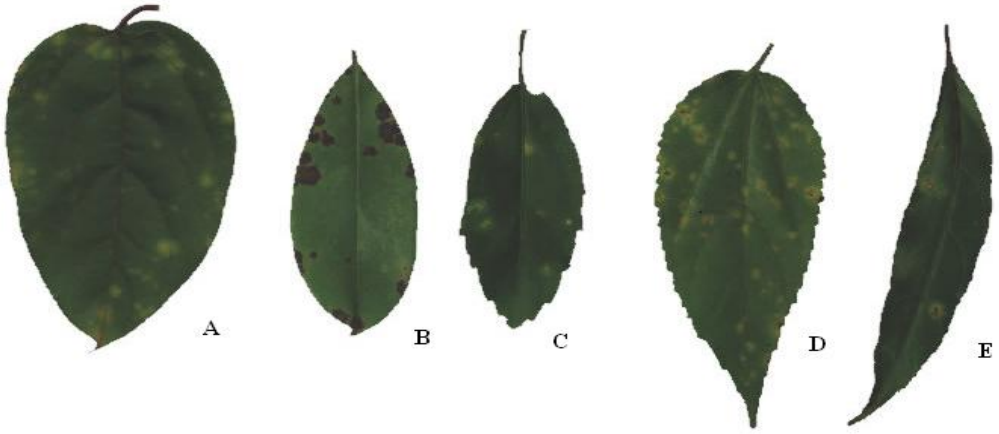

Figura 9: Sintomas do ClCSV transmitidos por *Brevipalpus phoenics.* (A) *Clerodendrum x speciosum,* (B) *Annona Muricata,* (C) *Hibiscus schizopetalus,* (D) *Malvaviscus arboreus,* (E) *Salvia leucantha*

Segundo Matthews (1992), as alterações histológicas induzidas na planta hospedeira susceptível podem ser de três tipos principais: necrose ou morte de células, tecidos ou órgãos; hipoplasia, que pode ocasionar diferenciação das células e hiperplasia, na qual a divisão celular pode ter início em células totalmente diferenciadas, ou divisões anormais podem ocorrer no tecido cambial. Freqüentemente a necrose e a hiperplasia ocorrem em conjunto, sendo que a hiperplasia pode causar a produção de células anormais com baixo potencial de sobrevivência e essas células podem tornar-se necróticas (ESAU, 1967).

As lesões cloróticas representam uma fase inicial das lesões foliares. Na análise anatômica dessas lesões nota-se a ocorrência de alterações no conteúdo celular da epiderme, do parênquima paliçádico e do parênquima lacunoso. Nas células da epiderme nota-se a presença de conteúdo granular (Figura 10C). Além da alteração do conteúdo das células do parênquima paliçádico, ocorrem também alterações nos cloroplastos do parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 10 A-C). Chagas (1978) ao analisar tecidos infectados com CoRSV também observou alterações como

a diminuição dos cloroplastos nas células do parênquima paliçádico e nas células do parênquima lacunoso contíguas as do parênquima paliçádico.

Observa-se também nas lesões cloróticas a ocorrência de hipertrofia nas células do parênquima lacunoso em regiões próximas onde ocorrem células plasmolisadas (Figura 10 D-E). Marques (2008) também observou em tecidos infectados com CILV-N células do mesofilo plasmolisadas, além do aumento da espessura do limbo foliar devido a hipertrofia e a atividade hiperplásica das células do parênquima lacunoso. Em folhas infectadas por OFV e por SvRSV também observou-se a ocorrência de hipertrofia nas células do parênquima lacunoso. Kubo (2006) observou células hipertrofiadas com o conteúdo vazio e parede celular pouco densa em plantas infectadas com o OFV e Ferreira (2005) observou células do parênquima lacunoso hipertrofiadas em folhas infectadas com o SvRSV.

Em lesões causadas pelo CiLV-C em folhas de laranjeiras, Gomes et al. (2004) analisaram as células hipertrofiadas e em hiperplasia através de microscopia eletrônica e constataram que raramente notam-se evidências de invasão das mesmas pelo vírus, indicadas pela ausência de presumíveis partículas virais e do viroplasma. Segundo Marques (2008), a presença de células hipertrofiadas e em hiperplasia no halo intermediário das lesões causadas por CILV-N poderiam em conjunto com o halo necrótico promover uma barreira para que o vírus permanecesse confinado à lesão.

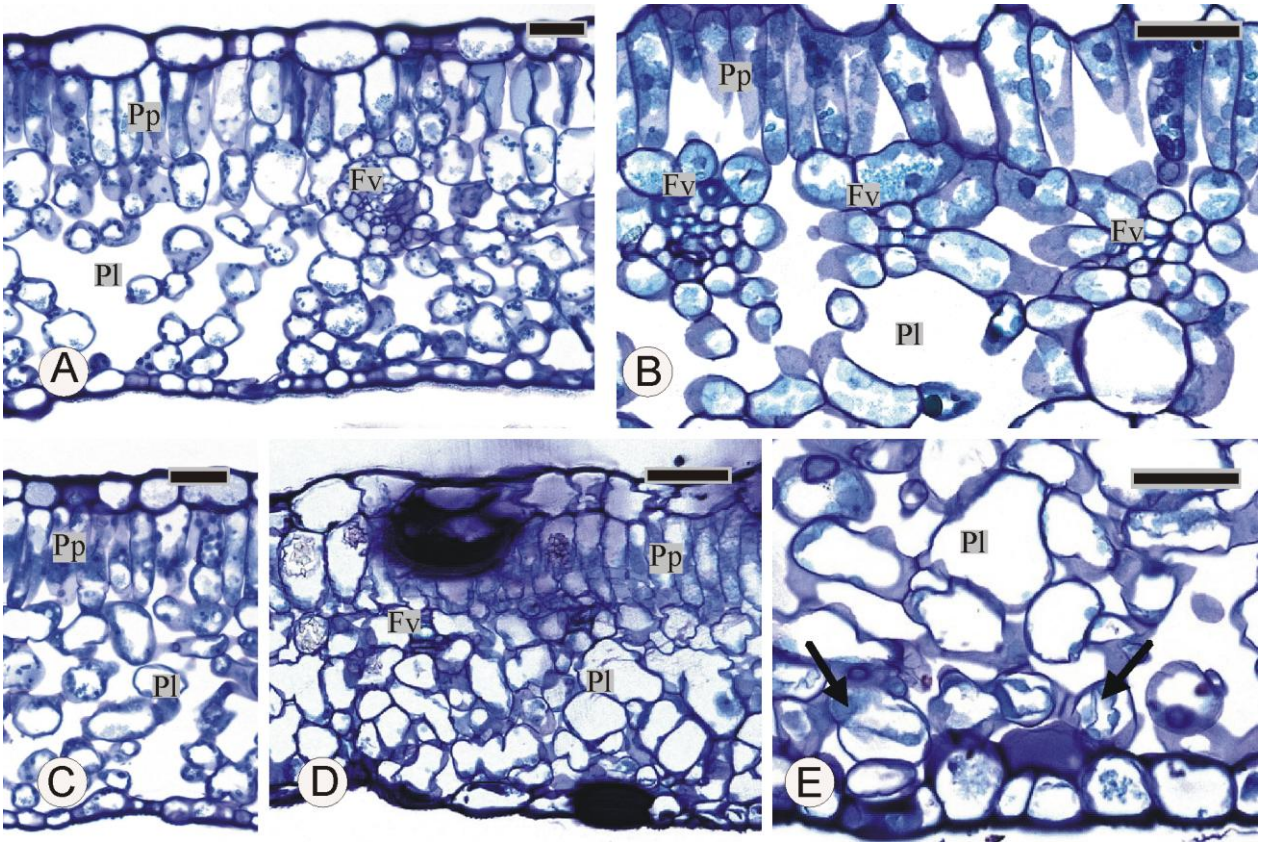

Figura 10: Cortes transversais da fase inicial das lesões foliares causadas pelo ClCSV corados com azul de toluidina. A e C. Lâmina foliar de *Clerodendron x speciosum* (Barra 30 µm). B. Lâmina foliar de *Annona muricata* (Barra 30 µm). D e E. Lâmina foliar de *Hibiscus schizopetalus* (Barras 50 µm e 30 µm). Observar o conteúdo granular das células epidérmicas, os cloroplastos alterados em B e as células hipertrofiadas e plasmolisadas (setas em E). Fv – Feixe Vascular; Pl – Parênquima Lacunoso; Pp – Parênquima Paliçádico.

Após a reação com o cloreto de zinco iodado, observou-se a diminuição da quantidade de grânulos de amido (corados de preto) nos tecidos lesionados (Figura 11 A e C) em comparação com o tecido sadio (Figura 11 B e D). Marques (2008) também relatou a ocorrência de decréscimo na quantidade de grãos de amido em lesões foliares causadas pela leprose do citros, tanto no tipo nuclear como no citoplasmático, e propõe que esta diminuição pode estar relacionada com as alterações causadas pelo ácaro durante a sua alimentação ((TOMCZYK; KROPCZYNSKA, 1985) ou durante o processo de infecção pelo vírus, onde há indução da expressão dos genes para a enzima α-amilase (FREITAS-ASTÚA et al., 2007) a qual pode estar relacionada com a degradação de amido.

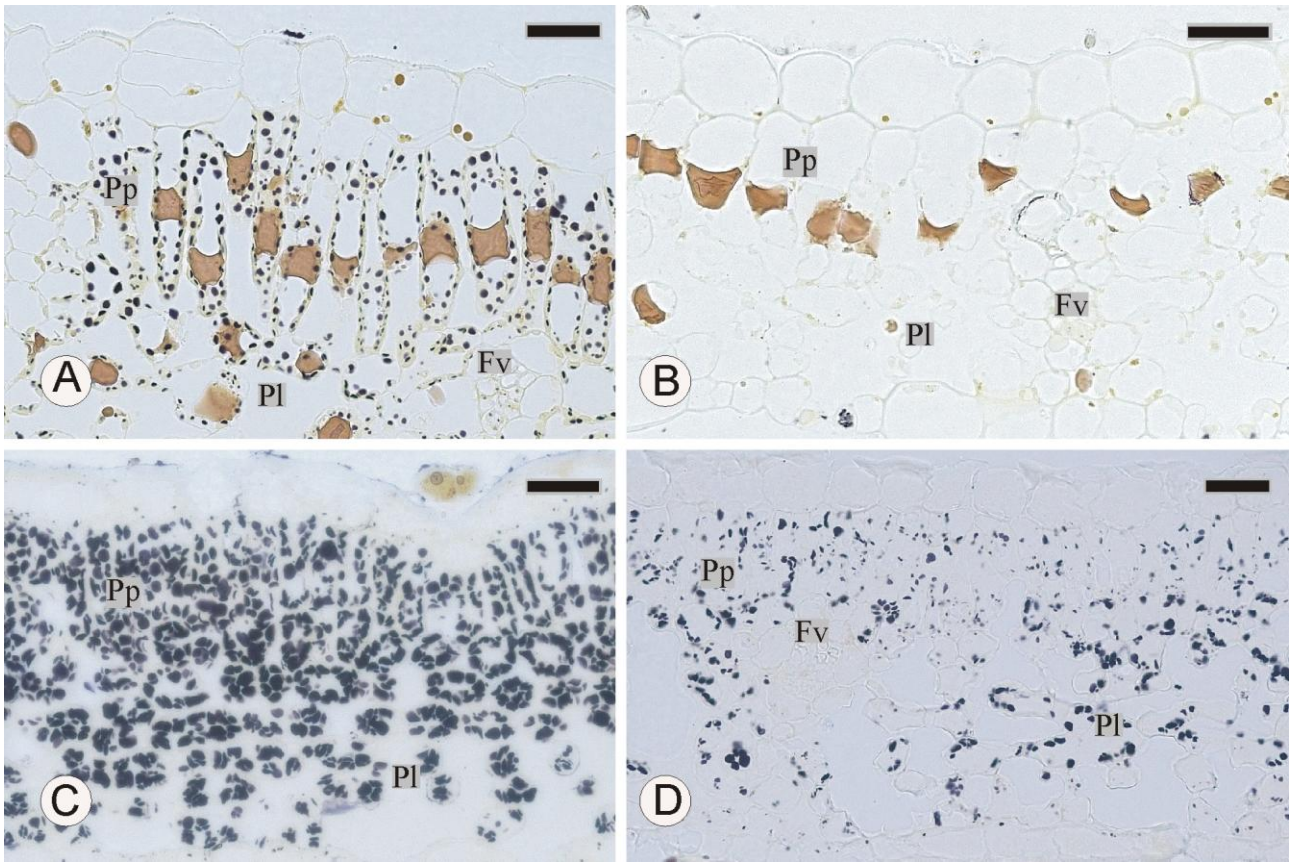

Figura 11: Cortes transversais da fase inicial das lesões foliares causada pelo ClCSV após a reação com cloreto de zinco iodado. A e B. Lâminas foliares de *Malvaviscus arboreus* sadia e com lesão, respectivamente. C e D. Lâminas foliares de *Salvia leucantha* sadia e com lesão, respectivamente. Observar a diminuição (B e D) dos grãos de amido nas lesões em comparação com os tecidos sadios (A e C) (Barras 30 µm). Fv – Feixe Vascular; Pl – Parênquima Lacunoso; Pp – Parênquima Paliçádico.

As lesões necróticas representam uma fase mais avançada da doença, posterior a etapa onde ocorrem manchas cloróticas. Através da análise anatômica destas lesões pode-se observar o conteúdo celular alterado da epiderme, parênquima paliçádico (Figura 12 A-D) e lacunoso (Figura 12 B-E). Nota-se também o colapso da epiderme e a deformação das células do parênquima paliçádico e lacunoso (Figura 12 C e D). Chagas (1978) ao analisar tecidos infectados com CoRSV também observou alterações na organização do parênquima paliçádico, através de deformações de suas células e degenerescência dos cloroplastos.

Além dessas alterações, houve a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima lacunoso (Figura 12 D). Segundo Esaú (1938), as lesões necróticas podem apresentar

hipertrofia e hiperplasia, sendo que estas alterações podem variar conforme o tipos de vírus que causam a doença. Marques (2008) observou uma acentuação da hipertrofia celular nas lesões avançadas causadas tanto por CiLV-C como por CiLV-N. Observou-se também a ocorrência de lise da célula do parênquima lacunoso e na região da nervura central (Figura 12 E e F), provavelmente após a ocorrência de hipertrofia dessas células.

Num estágio mais avançado das lesões necróticas observaram-se depressões resultantes da obliteração de células da epiderme (Figura 13 A e E) e a presença de conteúdo granular além de células totalmente necrosadas (Figura 13 A-E). Marques (2008) também observou a ocorrência de depressões isoladas na superfície do limbo foliar de plantas com sintomas de CiLV-C, resultantes da intensa obliteração das células da epiderme e do parênquima lacunoso. Chagas (1978) efetuou cortes em lesões de folhas infectadas com CoRSV de aspecto necrótico e observou que as células da epiderme superior mostravam-se deformadas. Ocorria também a deformação e necrose do parênquima paliçádico, que se apresentava adensado, não sendo mais possível verificar estruturas celulares como cloroplastos ou núcleo.

Nota-se também a ocorrência de hipertrofia das células do parênquima paliçádico e lacunoso, ocasionando a lise celular (Figura 13 A e B) e alterações no feixe vascular (Figura 13 C e D). Segundo Esau (1967), a necrose no parênquima lacunoso causa o colapso das nervuras menores, sendo que inicialmente ocorre a necrose das células da bainha nos feixes vasculares seguida da necrose do floema imaturo, alcançando por fim o xilema e o floema diferenciados. Marques (2008) também relatou que a lise celular e a concomitante necrose do parênquima paliçádico em folhas de laranjeiras infetadas pelo CiLV-N atingiram feixes vasculares, levando ao colapso dos mesmos. Segundo este autor, o colapso dos feixes vasculares poderia limitar o deslocamento do CiLV-N a longas distâncias, enquanto a necrose celular interferiria no deslocamento a curta distância, célula-à-célula.

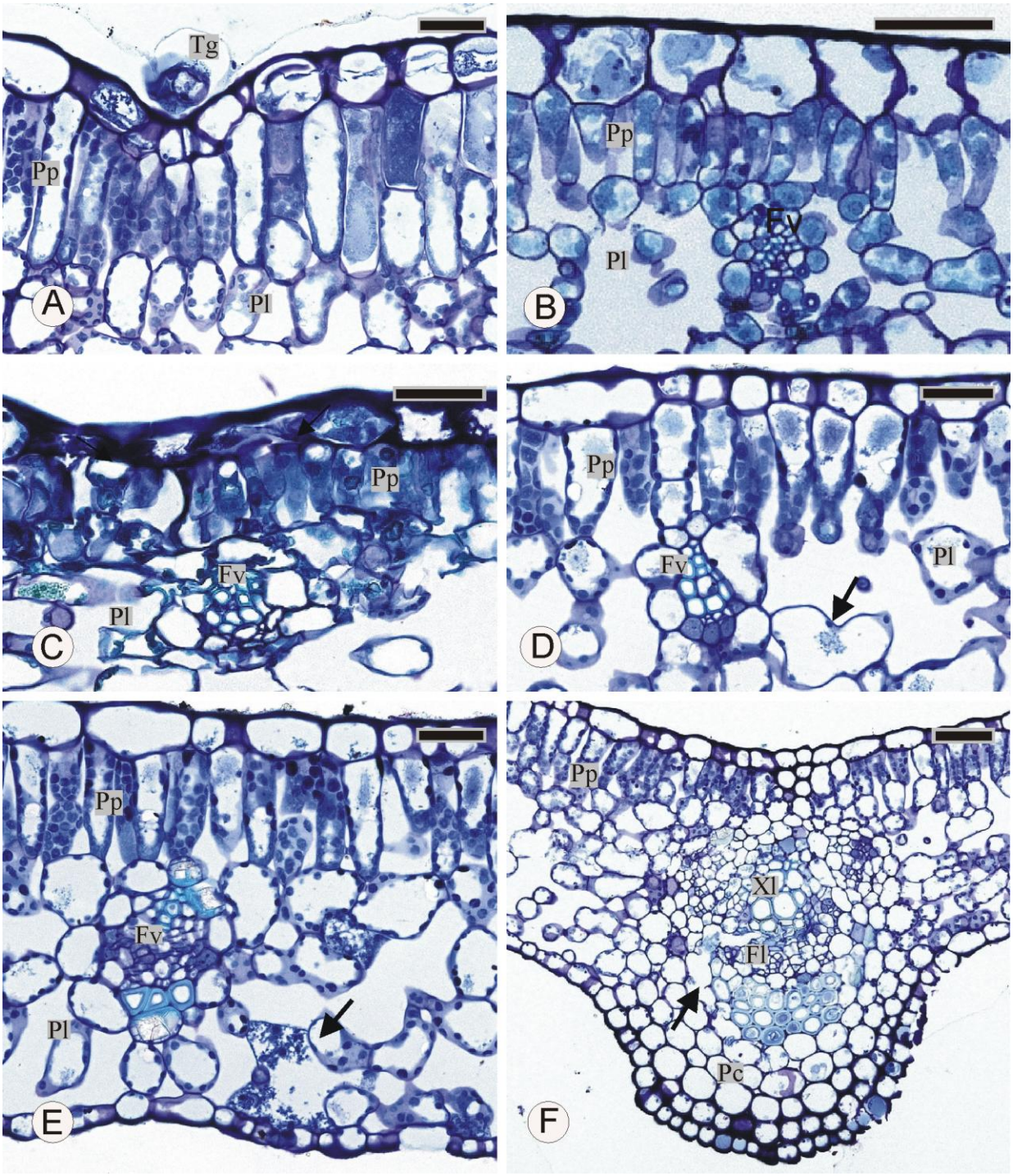

Figura 12: Cortes transversais da fase avançada das lesões foliares corados com azul de toluidina. A, D, E e F. Lâmina foliar de *Clerodendron x speciosum* (A, D e E Barras 30 µm e F Barra 50 µm). B. Lâmina foliar de *Annona muricata* (Barra 50 µm). C. Lâmina foliar de *Salvia leucantha* (Barra 30 µm). Observar conteúdo celular alterado da epiderme, do parênquima paliçádico (A-D) e do parênquima lacunoso (B-E). C. Colapso da epiderme (setas) e deformação das células do parênquima paliçádico e lacunoso. D. Hipertrofia e hiperplasia das céulas do parênquima lacunoso (seta). E. Lise da célula do parênquima lacunoso (seta). F. Lise celular na região da nervura central (seta) Fl – Floema; Fv – Feixe Vascular; Pl – Parênquima Lacunoso; Pp – Parênquima Paliçádico; Tg – Tricoma Glandular; Xl – Xilema.

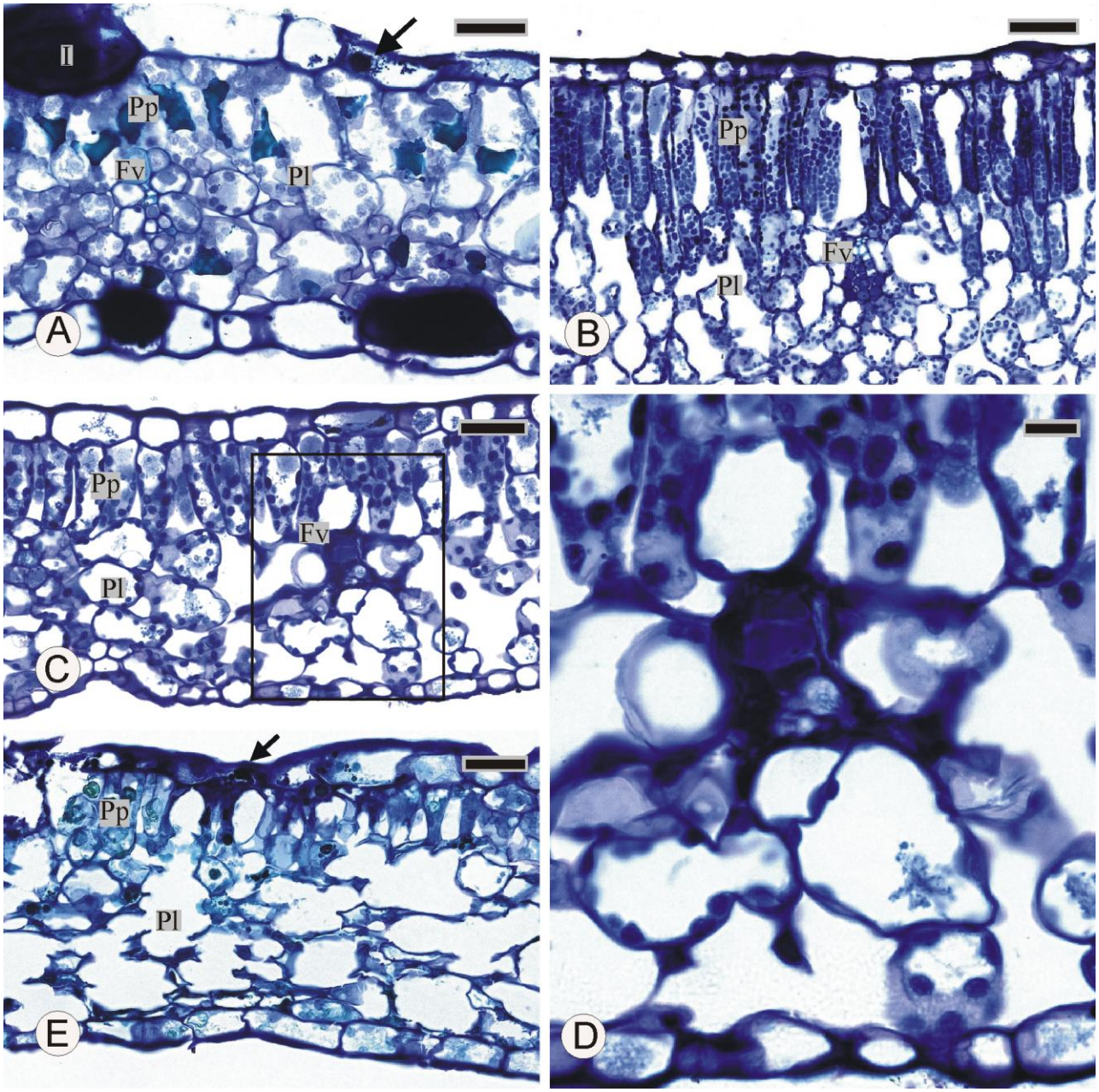

Figura 13: Cortes transversais da fase avançada das lesões foliares corados com azul de toluidina. A. Lâmina foliar de *Malvaviscus arboreus* (Barra 30 µm). B e C. Lâmina foliar de *Clerodendron x speciosum* (Barras 30 µm). D. Região em destaque em C (Barra 10 µm). E. Lâmina foliar de *Salvia leucantha* (Barra 30 µm). Observar depressões na epiderme (setas) em A e E e alterações no conteúdo celular (A-E). A. Hipertrofia das células do parênquima paliçádico e lacunoso. C e D. Alterações no feixe vascular e no conteúdo das células do parênquima paliçádico e lacunoso. E. Lise intensa das células do parênquima paliçádico e lacunoso. Fv – Feixe Vascular; I – Idioblasto; Pl – Parênquima Lacunoso; Pp – Parênquima Paliçádico;

.

Estes efeitos citopáticos devem representar o efeito da invasão e replicação do ClCSV e também dos mecanismos de reação da planta para impedir a expansão da lesão. Aparentemente na maioria dos casos de infecção por VTB, seja nuclear ou citoplasmático, em condições normais, a infecção termina por ficar limitada na lesão e os vírus não se tornam sistêmicos. O movimento célula-à-célula condicionada pela proteína de movimento permite a expansão inicial da lesão, mas os mecanismos de defesa da planta terminam por restringir esta expansão. Há algum mecanismo ainda não compreendido que dificulta a infecção dos tecidos da região vascular e como conseqüência a translocação do vírus a grandes distâncias via floema. Contudo, em hospedeiras com *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor,* caso as plantas infetadas sejam mantidas a temperaturas mais altas (28-30 ºC), alguns VTB do tipo nuclear como OFV, CoRSV e ClCSV, tornam-se sistêmicos (KONDO et al., 2003; BOARI et al., 2006a; KITAJIMA et al., 2008). Neste caso os mecanismos que dificultam a infecção dos tecidos vasculares seriam superados e os vírus atingiriam as células condutoras do floema e se dispersariam para outras regiões da planta.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ClCSV, OFV e CoRSV provavelmente representem espécies distintas, podendo fazer parte do novo gênero *Dichorhabdovirus*, proposto para OFV (KONDO et al., 2006).

- O ClCSV pode sofrer pequenas variações conforme a hospedeira.

- As análises anatômicas demonstraram o ClCSV causa alterações foliares semelhantes nas diferentes hospedeiras.

- ClCSV apresenta alterações celulares em comum com os outros VTBs (CiLV-N, CiLV-C, CORSV, SvRSV e OFV).

- A necrose celular pode ser uma maneira de limitar o deslocamento do vírus.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, B.K. ; KITAJIMA, E.W. ; KUBO, K; REZENDE, J.A.M. Transmissão do vírus da mancha clorótica do Clerodendrum. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 13., 2005, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 2005. 1 CD-ROM.

ANTONIOLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTUA, J.; LOCALI-FABRIS, E.C.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Detecção do vírus da pinta verde do maracujazeiro (*Passion fruit* green spot virus-PFGSV) através de RT-PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Anais eletrônicos...** Salvador: SBG, 2008. Disponível em: <http://www.sbg.org.br/congress.html>. Acesso em: 23 dez 2008.

ARAYA-GONZÁLES, J. **Informe sobre la prospección de la leprosis de los cítricos en la zona fronteriza sur (Costa Rica-Panama).** San Jose: Ministerio de Agricultura y Ganaderia, 2000. 5 p.

BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; YAMAMOTO, P.T. Adeus a leprose. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 37, 2002.

BOARI, A.J.; KUBO, K.S.; ALCÂNTARA, B.K.; KITAJIMA, E.W. Purificação do vírus da mancha clorótica do *Clerodendrum.* In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 29, 2006, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Grupo Paulista de Fitopatologia, 2006a. 1 CD-ROM.

BOARI, A.J.; FIGUEIRA, A.R.; NEDER, D.G.; SANTOS, R.C.; ROSSI, M.L.; NOGUEIRA, N.L. Vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 192-194, 2006b.

BOARI, A.J.; FIGUEIRA, A.R.; NEDER, D.G.; INFIESTA, L.R.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Efeito da temperatura na infecção sistêmica de *Chenopodium quinoa* pelo Coffee ringspot virus (CoRSV). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 246-247, 2003. Suplemento.

BOARI, A.J.; FREITAS-ASTUA, J.; FERREIRA, P.T.O.; NEDER, D.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Purification and serology of the coffee ringspot vírus. **Summa Phytopathologica,** Botucatu, v. 30, p. 453-458. 2004.

CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; MACHADO, M.A. In situ immunocytochemistry of citrus leaves infected with Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Tropical Plant Pathology,** Brasília, v. 33, p. 288, 2008. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

CHAGAS, C.M**. Mancha anular do cafeeiro:** transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anátomo-patológicos. 1978. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

_____. Morphology and intracellular behaviour of coffee ringspot virus (CRV) in tissues of coffee (*Coffea arabica* L.). **Phytopathologische Zeitschrift,** Berlin, v. 99, p. 301-309, 1980.

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

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

CHANG, M.U.; ARAI, K.; DOI, Y.; YORA, K. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck vírus. **Annual Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 156-167, 1976.

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

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

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 30, p. 181-202, 2003b.

COBO, N.C.M. **Ácaros *Tenuipalpídae* (Acari: Prostigmata) no Brasil, novos relatos para América do Sul e Caribe e variabilidade morfológica e morfométrica de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes).** 2006. 392 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

CORTELAZZO, A.L. **Caracterização celular e bioquímica de sementes.** Campinas: UNICAMP, 2007. 13 p.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Ultrastructure of bacilliform virus found in *Eunonymus japonicum* with mosaic and *Cymbidium* with ringspot. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 35, p. 388, 1969.

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. Orchid fleck vírus**. Description of Plant Viruses**, **CMI/AAB,** Kew, n. 183, p. 1-3, 1977.

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

ESAU, K. Some anatomical aspects of plant virus disease problems. **Botanical Review**, New York, v. 4, p. 548-579, 1938.

_____. Anatomy of pant virus infections. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 5, p. 45-76, 1967.

FAWCETT, H.S**. Citrus diseases and their control**. New York: McGraw Hill, 1936. 582 p.

FERREIRA, P.T.O. **Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaefolium* transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* geijskes (Acari: Tenuipalpidae).** 2005. 85 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FERREIRA, P.T.O.; FREITAS-ASTUA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W. Dados preliminares de transmissão mecânica e por ácaros de alguns dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 250, 2003. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia.

FIGUEIRA, A.R. Vírus da mancha-anular do cafeeiro tem causado prejuízos relevantes aos cafeicultores da região do Alto Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 299, 1995.

FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M; KITAJIMA, E.W. Incidence of orchid viruses in the state of São Paulo, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 125-130, 1999.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Further evidence to support that Citrus leprosis viruscytoplasmic and nuclear types are different viruses. In: CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD AMERICANA DE FITOPATOLOGÍA, 45., 2005, Porto Rico. Porto Rico: División Caribe, 2005. 1 CD-ROM.

FREITAS-ASTÚA, J.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; KITAJIMA, E.W.; HILF, E.C.; GOTTWALD, E.C.; MACHADO, M.A. Nationwide detection of *Citrus leprosis virus* in Brazil using RT-PCR. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004. **Programs & abstracts…** Monterrey: ARS, 2004. p. 189.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASÍLIO PALMIERI, A.C.; SILVA-PINHATI, A.C.; TARGON, M.L.PN.; MACHADO, M.A. Diffrentially expressed estress-related genes in the compatible Citrus-Citrus leprosis vírus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, suppl. 3, p. 980-990, 2007.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v. 63, n. 1/2, p. 9-16, 1997.

GOMES, R.T.; MARQUES, J.P.R.; SALAROLI, R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; KITAJIMA, E.W. Análise ultra-estrutural de lesões foliares causada pela leprose do citros – tipo citoplasmático – e distribuição das células infectadas na lesão. In: MOSTRA ACADÊMICA, 12.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 2004, Piracicaba. **Resumo expandido...** Piracicaba: UNIMEP, 2004. 1 CD-ROM.

GÓMEZ, E.C.; VARGAS, M.R.; RIVADAMEIRA, C.; LOCALI, E.C; FREITAS-ASTÚA, J; ASTUA-MONGE, G.; RODRIGUES, J.C.V.; MESA COBO, N.C.; KITAJIMA, E.W. First report of the Citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. **Plant Disease,** St. Paul, v. 89, n. 6, p. 686, 2005.

HARAMOTO, F.H. **Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939)(Acarina: Tenuipalpidae)**. Honolulu: Agricultural Experimental Station, 1969. 63 p. (Technical Bulletin).
HELLE, W.; BOLLAND, H.R.; HEITMANS, W.R.B. Chromossomes and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica,** Amsterdam, v. 54, p. 545-550, 1980.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology,** New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J. Manchas cloróticas em *Clerodendrum x speciosum* e mancha anular em *Solanum violaefolium* associadas a efeitos citopáticos similares aos dos vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus.* **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 133-134, 2000.

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

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

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTÚA, J. Updating the list of plant species naturally infected with viruses transmitted by *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae). In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY-CARIBBEAN DIVISION, 45.,2005, San Jose. **Anais...** SanJose: APS, 2005a. 1 CD-ROM.

KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTUA, J. Plantas infectadas naturalmente por vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., Viçosa, 2006. **Resumos...** Viçosa: UFV,

2006. p. 251.

KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Shot, rod-like particles associated with *Citrus* leprosis. **Virology**, Amsterdam, v. 50, p. 254-258, 1972.

KITAJIMA, E.W.; FERREIRA, P.T.O.; SALAROLI, R.B.; ALCANTARA, B.K.; KUBO, K.S. Disseminação natural do vírus da mancha clorótica de *Clerodendrum* para diferentes hospedeiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. S185, 2005b. Supplement.

KITAJIMA, E.W.; ROSILLO, M.A.; PORTILLO, M.M.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletronica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v. 9 p. 55-56, 1974.

KITAJIMA, E.W.; GROOT, T.V.M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTUA, J.; ALBERTI, G.; MORAES, G.J. In situ observtion of the Cardinium symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. **Experimental and Applied Acarology,** Amsterdam, v. 42, p. 263-271, 2007.

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

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 a model for the virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology,** Brasília, v. 33, p. 289, 2008a. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

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

KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in *Citrus*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF *CITRUS* VIROLOGISTS, 1968, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1968. p. 332-341.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental and Applied Acarology,** Dordrecht, v. 30, 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**, Reading, v. 87, p. 2413-2421, 2006.

KONDO, H.; MATSUMOTO, J.; MAEDA, T.; INOUYE, N. Host range and some properties of orchid fleck virus isolated from oriental *Cymbidium* in Japan. **Bulletin Research Institute for Bioresource, Okayama University**, Okayama, v. 3, p. 151-161, 1995.

KRUPPA, P.C.; RUSSOMANNO, O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 72-75, 2008.

KUBO, K. **Detecção e variabilidade do gene de nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas ("Orquid fleck virus" - OFV)**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura"Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2006.

KUBO, K.S.; ANTONIOLLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W. Diagnose molecular do vírus da mancha clorótica do *Clerodendrum* (CLCSV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p. 12, 2007.

LEON, G.A.; REALPE, C.E.; GARZON, P.A.; RODRIGUEZ, J.A.; MORENO, M.G.; CHILDERS, C.C.; ACHOR, D.S.; FREITAS-ASTUA, J.; ANTONIOLI-LUIZONI, R.; MESA, N.C.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência da leprose dos citros na Colômbia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 10, 2006. Suplemento.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Confirmação da presença de dsRNAs associados a *Citrus* leprosis virus (CiLV) e *Orchid* fleck virfus (OFV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, p.76, 2003a.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BOARI, A.J.; MACHADO, M.A. Diagnose da mancha anular do cafeeiro através de RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 185, 2005a. Suplemento.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; BOARI, A.J.; RODRIGUES, V.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Análise comparativa de genomas de vírus transmitidos por *Brevipalpus* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Riberão Preto: São Francisco, 2005b. 1 CD-ROM.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE,G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v**.** 87, p. 1317-1321. 2003b.

LOCALI-FABRIS, E.C.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; CALEGARIO, R.F.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. In vitro expression and production of antiserum to the capsid protein (P29) of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology,** Brasília, v. 33, p. 289, 2008. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais do Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088 p.

MAEDA, T.; KONDO, H.; MITSUHATA, 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, Edinburgh. **Proceedings...** Edinburgh: APS, 1998. v. 3, p. 13-18.

MAIA, O.M. de; OLIVEIRA, C.A.L. de. Comportamento do ácaro da leprose dos citros Brevipalpus phoenicis (Geijskes) em cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 625-629, 2004.

MARQUES, 2008. **Análise histopatológica e perfil protéico de lesões Causadas pelo Citrus leprosis virus tipo nuclear e citoplasmático em *Citrus sinensis* (l.) Osbeck.** 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2008.

MATHEWS, R.E.F. **Fundamentals of plant virology.** 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1992. 403 p.

MOTHES, U.; SEITZ, K.A. Fine structural alterations of bean plant leaves by feeding injury of *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae). **Acarologia**, Montpellier, v. 23, n. 2, p. 149-157, 1982.

MURPHY, A.M.; CARR, J.P. Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic vírus* replication and cell-to-cell movement. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 128, p. 552-563, 2002.

MUSCUMECCI, M.R.; ROSSETTI, V.V. Transmissão dos sintomas da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis.* **Ciência e Cultura**, São Paulo,v. 15, p. 228, 1963.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ARRIVABEM, F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Effects of temperature, storage period and the number of individuals on the detection of the false spider mite Cardinium endosymbiont. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, p. 17-21, 2007.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ARRIVABEM, F.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Variabilidade genética de endossimbiontes CLO (Cytophaga-Like-Organism) presentes em populações de ácaros da leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2005. 1 CD-ROM.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; NAVIA, D.; SILVA, L.G.; MÜLLER, G.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Prevalência de endossimbiontes Cardinium em populações de ácaros *Brevipalpus phoenicis* de diferentes regiões brasileiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21., 2006, Recife. **Anais...** Recife: SEB, 2006. 1 CD-ROM.

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.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO JÚNIOR, H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; FRANCHISCINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of *Citrus leprosis* associated *virus*, cytoplasmatic type (CiLV-C). **Virus Genes**, Norwell, v. 32, p. 289-298, 2006.

RANGEL, E.; KITAJIMA, E.W.; CERMELL, M.; CENTENO, E. Recientes avances em el estúdio de la leprosis de los cítricos en Venezuela. In: CONGRESO NACIONAL DE FRUTALES, 7., 2000, São Cristobal. **Anais…** São Cristobal: Memorias, 2000. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, J.C.V. **Relações ácaro-vetor-planta no sistema leprose dos citros**. 2000. 168 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis vírus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil . **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161–179, 2003.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O**. Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

SPEGAZZINI, C. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay.**Annual Society Cientific Argentina,** Buenos Aires, v. 95, p. 155-188, 1920.

STEANE, D.A.; DEKOK, R.P.J.; OLMSTEAD, R.G. Phylogenetic relationships between *Clerodendrum* (Lamiaceae) and other Ajugoid genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** Michigan, v. 32, p. 39-45, 2004.

TOMCZYK, A.; KROPCZYNSKA, D. Effects on the host plant. In: HELE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites and their biology, natural enemies and control.** Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 1A, p. 317–329.

VERGANI, A.R. Transmission y naturaleza de la lepra explosiva del naranjo. **Ministerio de Agricultura de la Nacion Buenos Aires Instituto Sanidad Vegetal**. Série A, Buenos Aires, ano 5, n. 3, p. 1–11, 1945.

WEEKS, A.; MAREK, F.; BREEUWE, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science,** Washington, v. 292, p. 2479-2482, 2001.

WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KANE, E.; 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, p. 107-133, 2003.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo