

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS CÍTRICAS A
COLONIZAÇÃO DE *Brevipalpus yothersi* (ACARI:
TENUIPALPIDAE) E INFECÇÃO POR
CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C)**

**Ana Beatriz Piai Kapp
Engenheira Agrônoma**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS CÍTRICAS A
COLONIZAÇÃO DE *Brevipalpus yothersi* (ACARI:
TENUIPALPIDAE) E INFECÇÃO POR
CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C)**

Ana Beatriz Piai Kapp

**Orientador: Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade
Coorientadora: Prof^a. Dra. Juliana Freitas-Astúa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola).

K17r

Kapp, Ana Beatriz Piai

Resposta de defesa de plantas cítricas a colonização de *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) e infecção por citrus leprosis virus c (CiLV-C) / Ana Beatriz Piai Kapp. -- Jaboticabal, 2021

49 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Junior de Andrade

Coorientadora: Juliana Freitas-Astúa

1. Ácaro de plantas. 2. *Brevipalpus yothersi*. 3. CiLV-C. 4. Citrus
sinensis. 5. Laranja doenças e pragas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS CÍTRICAS A COLONIZAÇÃO DE *Brevipalpus yothersi* (ACARI: TENUIPALPIDAE) E INFECÇÃO POR CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C)

AUTORA: ANA BEATRIZ PIAI KAPP

ORIENTADOR: DANIEL JUNIOR DE ANDRADE

COORIENTADORA: JULIANA DE FREITAS ASTÚA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



P/Profa. Dra. MARIA ANDREIA NUNES (Participação Virtual)
Universidade Estadual do Piauí-UESPI / Piauí//PI



P/Pós-Doutoranda GABRIELLA DIAS ARENA (Participação Virtual)
IAC - Instituto Biológico / Cordeirópolis/SP



Jaboticabal, 27 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA BEATRIZ PIAI KAPP – Nasceu em 14 de fevereiro de 1996, em Colina, Estado de São Paulo. A partir de 2011, cursou o ensino Técnico em Agropecuária, na Escola Técnica Agropecuária Municipal “São Francisco de Assis”, também no município de Colina, com término em 2013. Ingressou no curso de Agronomia em 2014, no Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, na cidade de Barretos, São Paulo. Durante a graduação, fez parte do Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos - LEEA, localizado na mesma instituição, onde realizou projetos na área de eficácia de herbicidas, controle de plantas daninhas terrestres e aquáticas, e ecotoxicologia de organismos bioindicadores. Participou do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq/UNIFEB, assim como desenvolveu seu TCC sob orientação do Prof. Dr. Claudinei da Cruz. Recebeu o título de bacharela em Agronomia em dezembro de 2018, e em 2019 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. Durante este período, foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil – CAPES, atuando na Área de Entomologia, com ênfase em Acarologia Agrícola, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade e da Profa. Dra. Juliana Freitas-Astúa.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

Dedico,

Aos meus pais, Ana Paula Piai Kapp e Fernando César Kapp, e ao meu irmão Fernando Henrique Piai Kapp. Agradeço o amor incondicional, apoio e principalmente por sempre estarem presentes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, e por me conceder forças no decorrer desta jornada, que é parte do meu propósito de vida.

Aos meus pais Ana Paula Piai Kapp e Fernando César Kapp, e ao meu irmão Fernando Henrique Piai Kapp, meus eternos alicerces, que nunca mediram esforços ao trilharem este caminho comigo.

Aos meus amigos Marcus Domingues Girardi, Taís Delcorso Gonzaga, Victória Fernanda Marchi dos Santos e Wanderson Luiz Freschi Sandrini pela amizade e presença, mesmo longe. Não menos importante, à minha amiga Klara Silva Castro, que além da amizade, dividiu a vida e as responsabilidades ao morarmos juntas.

A Jaqueline Franciosi Della Vechia, que considero não somente como amiga, mas como mentora e peça fundamental em minha vida profissional e pessoal.

A todos os amigos conquistados na Entomologia, que foram essenciais ao fazerem do mestrado um período mais leve a ser percorrido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Júnior de Andrade, por me aceitar como parte de sua equipe, pelos importantes ensinamentos profissionais e pessoais, atenção e disponibilidade durante todo mestrado.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Juliana Freitas-Astúa, por aceitar o desafio de coorientar à distância, pelo conhecimento transmitido, receptividade em seu laboratório e atenção sempre dispensados.

A Thais Elise Sinico pela amizade, atenção e por toda ajuda necessária para realização dos testes moleculares.

Ao Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho e ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação do Mestrado.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pelo acolhimento e oportunidades ao concederem toda infraestrutura e recursos necessários durante o mestrado.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pelo conhecimento compartilhado, e por me fazerem ter certeza de que escolhi a área certa.

Aos integrantes e colegas do Grupo de Estratégias e Manejo de Ácaros Neotropicais (GEMAN), Jaqueline Franciosi Della Vechia, Sidneia Terezinha Soares de Matos, Daiana Paixão Nogueira Silva, Patrice Jacob Savi, Claudiane Martins da Rocha e Leilane Martins Lacerda, pela convivência e ajuda nos trabalhos.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pela disponibilização das plântulas de citros necessárias.

A todas as pessoas que mesmo indiretamente, participaram de forma positiva na conclusão desta fase.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Citricultura	3
2.2. A leprose dos citros.....	4
2.3. <i>Brevipalpus yothersi</i> (Acari: Tenuipalpidae).....	6
2.4. Patossistema leprose: interação artrópode, fitopatógeno e planta.....	8
2.5. O mecanismo de defesa vegetal.....	10
2.6. Hormônios envolvidos no mecanismo de defesa vegetal	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Locais dos trabalhos	13
3.2. Colônia de ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> avirulíferos.....	14
3.3. Colônia de ácaros <i>Brevipalpus yothersi</i> virulíferos.....	14
3.4. Detecção de CiLV-C em ácaros por RT-PCR	15
3.5. Instalação e execução dos experimentos	16
3.5.1. Experimento preliminar	16
3.5.2. Experimento principal	19
3.6. Avaliação dos genes marcadores das vias de ácido salicílico (<i>PR1</i>) e ácido jasmônico (<i>PR4</i>) em <i>Citrus sinensis</i>	22
3.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	22
3.6.2. Análise de expressão gênica	22
3.7. Análise dos dados.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1. Experimento preliminar	24

4.2. Experimento principal.....	24
4.2.1. Influência da primeira infestação e das lesões artificiais (mistura de gesso) e naturais (leprose).....	24
4.1.2. Análise de expressão gênica	27
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS.....	40

RESPOSTA DE DEFESA DE PLANTAS CÍTRICAS A COLONIZAÇÃO DE *Brevipalpus yothersi* (ACARI: TENUIPALPIDAE) E INFECÇÃO POR CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C)

RESUMO - A citricultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro. Contudo, é afetada por diversos problemas fitossanitários que aumentam seus custos de produção. Entre eles está a leprose dos citros, causada pelo citrus leprosis virus C (CiLV-C), e transmitida por *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae). O manejo da leprose é realizado principalmente por meio do controle do ácaro vetor, sendo de extrema importância a compreensão acerca de seu patossistema. Diante isto, os objetivos deste trabalho foram elucidar respostas de colonização de *B. yothersi* em citros sob infestação primária com ácaros virulíferos e avirulíferos, verificar o comportamento desses indivíduos mediante a presença de lesões naturais (leprose) e artificiais (mistura de gesso) nas plantas, e associá-lo aos mecanismos de defesa vegetal durante a interação entre planta, ácaro e vírus. Para tanto, foi estabelecido um experimento em casa de vegetação sobre mudas cítricas, composto por três tratamentos que contavam com plantas sem a primeira infestação de ácaros (controle), plantas com a primeira infestação de ácaros avirulíferos e plantas com a primeira infestação de ácaros virulíferos, cada um com quinze repetições. Após trinta dias, foram coletadas amostras para avaliação dos genes marcadores das vias de ácido salicílico (*PR1*) e ácido jasmônico (*PR4*). Dez dias após a coleta, foi adicionada uma mistura de gesso para mimetização de lesões no controle e no tratamento com ácaros avirulíferos, e transferidos ácaros avirulíferos para todos os tratamentos. Uma nova coleta foi realizada após trinta e cinco dias, e seguiu-se a contagem de todas as fases do ácaro. Como resultados, foram obtidos que a primeira infestação com ácaros e tanto a presença de lesões de leprose, quanto a mistura de gesso favoreceram o crescimento populacional de *B. yothersi* após a segunda infestação, independentemente da presença de CiLV-C. Além disso, foi demonstrado que *B. yothersi* induz a via de ácido jasmônico nas plantas ao se alimentar, enquanto o CiLV-C a reprime, e induz a via de ácido salicílico como forma de beneficiar o ácaro vetor. Deste modo, esclarecemos valiosos aspectos acerca da interação entre *C. sinensis*, *B. yothersi* e CiLV-C, que constituem o patossistema da leprose dos citros.

Palavras-chave: ácaro da leprose dos citros, ácido jasmônico, ácido salicílico, *Citrus sinensis*, patossistema leprose

DEFENSIVE RESPONSE OF CITRUS PLANTS TO *Brevipalpus yothersi* (ACARI: TENUIPALPIDAE) COLONIZATION AND CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C) INFECTION

ABSTRACT - Citriculture is one of the most lucrative sectors of Brazilian agribusiness. However, it is affected by several phytosanitary problems that increase its production costs. Between them is citrus leprosis, caused by citrus leprosis virus (CiLV-C), and transmitted by *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae). The leprosis management is performed mainly through the vector mite control, and understanding its pathosystem is extremely important. Thus, the objectives of this study were to elucidate colonization responses of *B. yothersi* in citrus under primary infestation with viruliferous and aviruliferous mites, to verify the behavior of these individuals through the presence of natural (leprosis) and artificial (gypsum mixture) lesions in the plants, and associate it with plant defense mechanisms during the interaction between plant, mite, and virus. Therefore, an experiment was established in a greenhouse on citrus seedlings, consisting of three treatments that had plants without the primary infestation of mites (control), plants with the primary infestation of aviruliferous mites, and plants with the primary infestation of viruliferous mites, each one with fifteen repetitions. After thirty days, samples were collected to evaluate the marker genes of the salicylic acid (*PR1*) and jasmonic acid (*PR4*) pathways. Ten days after collection, a gypsum mixture was added to mimic lesions in the control treatment and aviruliferous treatment, and aviruliferous mites were transferred to all treatments. After thirty-five days, the leaves were collected again, and the counting of all mite stages was performed. As a result, the primary infestation with mites and the presence of leprosis lesions and gypsum mixture favored the population growth of *B. yothersi* after the second infestation, regardless of the presence of CiLV-C. Furthermore, it was shown that *B. yothersi* induces the jasmonic acid pathway in plants when feeding, while CiLV-C represses it, and induces the salicylic acid pathway to benefit the vector mite. In this way, we clarify valuable aspects about the interaction between *C. sinensis*, *B. yothersi* and CiLV-C, which constitute the pathosystem of citrus leprosis.

Keywords: citrus leprosis mite, jasmonic acid, salicylic acid, *Citrus sinensis*, citrus leprosis pathosystem

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja-doce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) do mundo, sendo a citricultura um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro (USDA, 2021). Na safra de 2020/2021, o País foi responsável pela produção de 16,9 milhões de toneladas de laranjas, com destaque para o Estado de São Paulo que é o maior produtor nacional de laranja (IBGE, 2021a; Fundecitrus, 2021b; USDA, 2021). No entanto, problemas fitossanitários limitam a produtividade dos pomares brasileiros, e aumentam seus custos de manejo (Bassanezi, 2019; Fundecitrus, 2019).

Dentre as doenças que acometem as laranjeiras, destaca-se a leprose dos citros, causada pelo citrus leprosis virus C (CiLV-C) (Ramos-González et al., 2018). Trata-se de vírus de ação localizada, e que permanece restrito à área de alimentação do ácaro (Freitas-Astúa et al., 2018). No Brasil, foi responsável pela perda de 5,82 milhões de caixas de laranja devido aos altos índices de queda de frutos na safra 2020/2021 (Fundecitrus, 2021d).

A leprose dos citros, causada principalmente pelo CiLV-C, é caracterizada pela presença de lesões em folhas, frutos e ramos (Bastianel et al., 2010). Em frutos, inicialmente surgem lesões cloróticas circulares envoltas por halos amarelos, que depois tornam-se marrons e ligeiramente deprimidas. Nas folhas surgem lesões circulares, com centros marrom-escuros envoltos por halos cloróticos. Em ramos, as lesões são marrons, com aspecto corticoso e salientes que levam à seca e morte dos ramos (Rodrigues et al., 2003). Em consequência, ocorre diminuição da produtividade, e até mesmo morte de plantas severamente acometidas (Ramos-González et al., 2018).

O CiLV-C tem como vetores determinados ácaros do gênero *Brevipalpus*, dentre estes destaca-se a espécie *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae). Esses ácaros são conhecidos popularmente como ácaro da leprose dos citros ou ácaros planos, e são amplamente encontrados nos pomares cítricos brasileiros (Mineiro et al., 2018). Há relatos também da transmissão experimental do CiLV-C por *B. papayensis* Baker, no entanto, ainda não observada em condição de campo (Nunes et al., 2018). Ácaros *Brevipalpus* spp. apresentam capacidade de transmissão de vírus

conhecidos como Vírus Transmitidos por *Brevipalpus* - VTBs (Freitas-Astúa et al., 2018). Há pelo menos cinco VTBs associados a sintomas de leprose em citros, sendo eles, além do CiLV-C, o citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2; Roy et al., 2013), o citrus leprosis virus N (CiLV-N; Ramos-González et al., 2017), o orchid fleck virus (OFV; Cruz-Jaramillo et al., 2014) e o citrus chlorotic spot virus (CiCSV; Chabi-Jesus et al., 2018). Contudo, o CiLV-C é o prevalente e mais importante no Brasil, devido ao enorme prejuízo econômico e social causado (Bastianel et al., 2010; Chabi-Jesus et al., 2021).

Os ácaros adquirem o CiLV-C durante a alimentação em tecidos vegetais contaminados, e não há transmissão transovariana do vírus (Bastianel et al., 2010; Tassi et al., 2017). Para se alimentarem, os ácaros perfuram o parênquima das folhas, injetam saliva nas células do mesófilo por meio dos estiletes, e depois absorvem o conteúdo celular através da cavidade pré-oral (Alberti e Kitajima, 2014). Durante este processo, os ácaros podem adquirir e transmitir vírus por meio da saliva (Alberti e Kitajima, 2014).

As injúrias causadas pela alimentação dos ácaros podem ativar os mecanismos primários de defesa das plantas em resposta ao ataque do herbívoro. Em consequência, as plantas podem induzir o acúmulo de fitormônios, tais como o ácido salicílico (SA) e o ácido jasmônico (JA), que ativam uma reprogramação transcricional, sintonizando as respostas de defesa das plantas por meio da natureza da lesão provocada (Pieterse et al., 2012). Por outro lado, sabe-se também que insetos e ácaros secretam proteínas em sua saliva que modulam, e até reprimem, a resposta de defesa da planta (Kant et al., 2015).

Estudos realizados por Andrade et al. (2013) demonstraram que a densidade populacional de ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) (possivelmente *B. yothersi*) foi maior em plantas de laranja-doce infectadas com o CiLV-C em comparação às plantas isentas de vírus. Resultados semelhantes foram verificados por Arena et al. (2016), que observaram aumento populacional de ácaros da leprose em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. com a presença de CiLV-C.

Os estudos de Arena et al. (2016) consagraram o primeiro modelo de interação planta-ácaro-vírus, onde comprovou-se que a infecção viral induz respostas de

hipersensibilidade na planta e conseqüentemente pode provocar alterações no comportamento e na biologia de *B. yothersi*. Entretanto, este fato ainda não foi comprovado em plantas cítricas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar as respostas de colonização de *B. yothersi* em citros sob infestação primária com ácaros virulíferos (com CiLV-C) e avirulíferos (sem CiLV-C), verificar o comportamento destes indivíduos mediante a presença de lesões naturais (leprose) e artificiais (mistura de gesso) nas plantas, e associá-lo aos mecanismos de defesa vegetal durante a interação entre planta, ácaro e vírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura

No cenário mundial da citricultura, o Brasil ocupa o lugar de maior produtor de laranja, com aproximadamente 16,9 milhões de toneladas produzidas (USDA, 2021). Também colaboram com parte da produção global a China, União Europeia, Estados Unidos e México. Além disso, o Brasil é o líder na exportação do suco de laranja, contribuindo com 1,2 milhões de toneladas de um total de 1,8 milhões de toneladas (USDA, 2021). O país conta com uma área plantada de cerca de 643.996 hectares e o Estado de São Paulo é o responsável por uma área de 412.576 hectares (IBGE, 2021b). Conseqüentemente, as regiões que mais produzem citros no Brasil são o Cinturão cítrico de São Paulo e o Triângulo/Sudoeste Mineiro, que juntos totalizam 10,9 milhões de toneladas de laranja produzida (IBGE, 2021a; Fundecitrus, 2021b).

Considerando os resultados positivos alcançados ao longo dos anos, o setor cítrico também realiza um importante papel na movimentação do mercado de trabalho nacional. No ano de 2020, foi responsável por cerca de 6,33% dos empregos gerados pela agricultura no país. Sendo assim, entre as cadeias do agronegócio brasileiro, a citricultura contribui com a geração de, ao menos, 200 mil empregos, o que equivale a uma vaga empregatícia a cada nove hectares de pomar (Fundecitrus, 2021a).

A laranja também tem sua colaboração ambiental, já que nas propriedades que compõem o cinturão cítrico estão presentes 182 mil hectares de mata nativa

plantada (Fundecitrus, 2021c). Com isso, não apenas é realizada a manutenção da biodiversidade da fauna e da flora local, como também é estimulada a presença de polinizadores nos pomares. Ademais, pesquisas apontam que a citricultura colabora com a apicultura local, proporcionando a base para produção de 80% do mel no Estado de São Paulo (Fundecitrus, 2021c).

Embora o Brasil lidere a produção e a exportação de laranja, problemas fitossanitários limitam a produtividade dos pomares, assim como oneram os custos do manejo fitossanitário (Bassanezi et al., 2019). Um desses problemas é a ocorrência de pragas, que ocasionam tanto danos devido às suas atividades de infestação e alimentação, quanto à transmissão de fitopatógenos, debilitando de forma drástica a produção dos pomares comerciais (Tennant et al., 2009).

2.2. A leprose dos citros

A leprose dos citros foi relatada pela primeira vez na Flórida (EUA) no início do século XX e foi denominada na época de “*scaly bark*” e “*nail head rust*” devido aos sintomas característicos causados nas plantas (Bastianel et al., 2010; Ramos-González et al., 2018). Ao longo dos anos, a doença foi relatada em países da América do Sul, como Argentina (Frezzi, 1940) e Paraguai (Spegazzini, 1920), recebendo nomes como “lepra explosiva” (Bitancourt et al., 1955).

No Brasil, o primeiro comunicado sobre a leprose dos citros (na ocasião denominada de “variola”), foi feito por Bitancourt em 1934, em um levantamento de doenças observadas entre 1931 e 1932 no Estado de São Paulo. Sua presença foi confirmada na cidade de Sorocaba, acometendo laranjeiras doces (*C. sinensis*) (Bitancourt, 1934; Bastianel et al., 2010).

Apesar dos vários nomes atribuídos à doença, pesquisadores da área chegaram a um consenso de que as várias enfermidades descritas em cada país se tratava unicamente da “leprose”, assim nomeada em 1926 por Fawcett e Lee (Bitancourt et al., 1955; Roy et al., 2015). Mais tarde, a existência da leprose foi dada apenas no continente americano, e está atualmente ausente nos Estados Unidos continental (Rodrigues et al., 2003; Childers et al., 2003a).

Após os anos 2000, a leprose voltou a ser reportada, desta vez na Costa Rica (Araya-González, 2000), Panamá (Dominguez et al., 2001), Guatemala (Mejia et al.,

2002), Bolívia (Gómez et al., 2005), Colômbia (León et al., 2006) e México (Izquierdo-Castillo et al., 2011), além dos mais recentes casos na África do Sul (Cook et al., 2019) e nos EUA (Havaí; Velarde et al., 2021). No entanto, hoje sabe-se que ao menos cinco vírus estão associados à doença (Chabi-Jesus et al., 2018).

A leprose é atualmente considerada a virose mais importante do cinturão citrícola de São Paulo, devido às grandes perdas econômicas ocasionadas (Laranjeira et al., 2015; Della Vechia et al., 2019). O fitopatógeno causador da doença trata-se de um vírus não-sistêmico, que permanece restrito à área da lesão de alimentação do ácaro vetor (Pascon et al., 2006). Seu processo de transmissão ainda não é totalmente elucidado, mas alguns autores sugerem que seja propagativo (Roy et al., 2015), e outros que seja persistente circulativo (Tassi et al., 2017). Todavia, estudos aprofundados estão sendo realizados para confirmar o tipo de interação com o ácaro vetor (Tassi et al., dados não publicados).

Em 1972, confirmou-se por meio de material sintomático proveniente de citros, a existência do citrus leprosis virus tipo nuclear. Isso se deu graças à observação de partículas semelhantes às de rhabdovírus, porém mais curtas, que ocorriam no núcleo ou no citoplasma, e estavam associadas à presença de um viroplasma no núcleo das células (Kitajima et al., 1972). No decorrer de análises realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em material sintomático, revelou-se a presença de partículas baciliformes curtas no retículo endoplasmático, além de viroplasma denso no citoplasma, confirmando também a existência do citrus leprosis virus tipo citoplasmático (CiLV-C) (Kitajima et al., 1974; Colariccio et al., 1995).

Além do CiLV-C, vírus prevalente nos pomares comerciais brasileiros (Chabi-Jesus et al., 2021) existem o citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) e o passion fruit green spot virus (PfGSV) (Roy et al., 2013; Ramos-González et al., 2020), que compõem o gênero *Cilevirus*, da família *Kitaviridae* e são denominados VTBs C (Freitas-Astúa et al., 2018).

O CiLV-C possui uma ampla gama de plantas hospedeiras experimentais (Arena et al., 2013; Garita et al., 2014), sendo que suas hospedeiras naturais incluem além de *Citrus* spp., *Swinglea glutinosa* (León et al., 2008) e *Commelina benghalensis* (Nunes et al., 2012). Seus sintomas característicos são a presença de lesões cloróticas, circulares e elípticas, com o centro necrótico em folhas, frutos e ramos

(Bastianel et al., 2010; Freitas-Astúa et al., 2018). Nas folhas, as lesões costumam ser circulares, com o centro marrom-escuro envolto por um halo clorótico. Nos frutos verdes, são inicialmente amareladas, depois tornam-se marrons e deprimidas, com possível presença de exsudação. Em ramos as lesões são acastanhadas, protuberantes e podem coalescer quando presentes em grande número, levando à desfolha, queda prematura de frutos e seca das hastes (Rodrigues et al., 2003; Bastianel et al., 2010) Em consequência, ocorre diminuição da produtividade, e até mesmo morte de plantas jovens severamente acometidas (Ramos-González et al., 2018).

Relatou-se em 1950, na Flórida, a associação da leprose à uma infestação de ácaros do gênero *Brevipalpus*, e posteriormente, demonstrou-se que *Brevipalpus obovatus* Donnadieu (Acari: Tenuipalpidae) coletados em *Bidens pilosa* L., foi capaz de estimular os sintomas da doença (Knorr, 1950). Porém, foi confirmado que o vetor da virose no país (que não se tratava do CiLV-C, mas sim um *Dichorhavirus*) era *Brevipalpus californicus* (Banks) (Acari: Tenuipalpidae) (Knorr, 1968; Rodrigues et al., 2003). Na Argentina, *B. obovatus* foi associado à leprose (Knorr e DuCharme, 1951), e no Brasil, foi observado que *B. phoenicis* (Geijkes) também foi capaz de induzir sintomas da doença (Musumeci e Rossetti, 1963). Após mais de 50 anos, foi comprovado que o ácaro responsável pela transmissão do CiLV-C, e predominantemente encontrado nos pomares cítricos do Brasil, é na verdade *B. yothersi* (Navia et al., 2013; Sánchez-Velázquez et al., 2015; Mineiro et al., 2018).

2.3. *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae)

Brevipalpus yothersi é uma espécie de grande relevância no ponto de vista econômico, pois apresenta alta capacidade de transmissão de VTBs (Freitas-Astúa et al., 2018). Este ácaro era classificado como *B. phoenicis* até 2015, e ao realizar uma reavaliação de suas características morfológicas e moleculares, demonstrou-se que não se tratava de uma única espécie, e sim diversas espécies inicialmente consideradas crípticas (Navia et al., 2013), que posteriormente foram reclassificadas por Beard et al. (2015). Com isso, foi constatado que *B. yothersi* é o principal vetor do CiLV-C nos pomares citrícolas do Brasil (Sánchez-Velázquez et al., 2015; Mineiro et al., 2018).

As características que são consideradas taxonomicamente importantes para diferenciação entre as espécies do grupo *B. phoenicis* são o tamanho e a forma das setas, microplacas na cutícula, espermateca e placas ventral e genital (Welbourn et al., 2003; Beard et al., 2015). Em específico, para o diagnóstico de *B. yothersi*, consideram-se as placas ventral e genital bem delimitadas, a presença de dois solenídeos no tarso II, palpo femorogenu com seta dorsal, microplacas na cutícula dorsal e espermateca oval, terminando em formato longo e distal (Beard et al., 2015; Mineiro et al., 2018).

Este ácaro é popularmente conhecido como “ácaro da leprose dos citros” uma espécie altamente polífaga e cosmopolita. (Mineiro et al., 2018). Suas características morfológicas básicas são o tamanho diminuto, idiossoma achatado dorso-ventralmente, e coloração laranja-avermelhada. Considera-se também que dada a idade, e o substrato de alimentação em que o ácaro se encontra, a coloração dos indivíduos adultos possa sofrer pequena variação (Chiavegato, 1986), adquirindo tons de marrom-avermelhado. Devido estes aspectos, *B. yothersi* também é denominado como “ácaro plano”.

Ácaros *B. phoenicis* sensu lato passam pelas fases de ovo, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto, com períodos quiescentes e imóveis entre cada fase, denominadas de protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida (Haramoto, 1966; Chiavegato, 1986). A duração das fases é altamente dependente das condições ambientais (temperatura e umidade), além do substrato onde se encontram, podendo variar de 14 a 43 dias de ovo à adulto. Entretanto, quando mantidos em frutos de laranja-doce em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 12 horas de fotófase), este período pode ser de aproximadamente 19 dias, com longevidade de 22 dias e cerca de 22 ovos por fêmea (Chiavegato, 1986). Estes ácaros são haploides durante seu ciclo de vida, e se reproduzem em sua maioria por partenogênese telítoca (Helle et al., 1980). Tal fenômeno se dá devido sua associação com uma bactéria simbiótica do gênero *Cardinium*, que resulta na “feminização” de indivíduos geneticamente machos, processo este ainda não totalmente elucidado (Weeks et al., 2001; Groot e Breeuwer, 2006).

Fêmeas de *B. phoenicis* sensu lato ovipositam na maioria das vezes em locais que conferem abrigo aos seus ovos até o período de eclosão das larvas. A escolha

varia entre lesões de doenças como verrugose causada por *Elsinoe fawceti* Bitancourt e Jenkins e *Elsinoe australis* Bitancourt e Jenkins, fendas, ramos, escamas de cochonilhas, e danos causados por lagartas (Haramoto, 1966; Chiavegato, 1986). Também é observado entre as fêmeas, o hábito de garantirem uma “camada protetora” aos ovos, que pode ser composta por exúvias e sujidades presentes no local (Rodrigues et al., 2001).

O ácaro pode adquirir e transmitir o CiLV-C em qualquer fase móvel ao se alimentar em locais da planta com a presença de vírus, mas não há transmissão transovariana do vírus (Bastianel et al., 2010; Tassi et al., 2017). Para se alimentar, o ácaro perfura o parênquima das folhas e injeta saliva nas células do mesófilo usando seus estiletos. Em seguida, absorve conteúdo celular que pode conter partículas virais de CiLV, através da cavidade pré-oral (Alberti e Kitajima, 2014). Entretanto, o mecanismo de circulação do vírus do lúmen do intestino médio para o espaço intercelular e o canal do estilete do ácaro, ainda não foi elucidado (Tassi et al., 2017; Zhou et al., 2020).

2.4. Patossistema leprose: interação artrópode, fitopatógeno e planta

Insetos e ácaros fitófagos podem afetar o desenvolvimento das plantas de forma direta e indireta (Lewinsohn et al., 2012). De forma direta, por ocasionarem danos físicos e debilitarem a planta, e de forma indireta ao transmitirem fitopatógenos ou facilitarem o acesso de fitopatógenos (Walling, 2000). Os fitopatógenos podem ser divididos em biotróficos (aqueles que dependem do hospedeiro vivo), hemibiotróficos (que apresentam uma fase biotrófica e outra necrotrófica), e necrotróficos (que sobrevivem e se multiplicam em tecidos mortos) (Yan et al., 2018). Dentro desta divisão, os vírus são considerados como essencialmente biotróficos.

Os tipos de transmissão dos fitopatógenos pelos seus respectivos vetores são classificados como circulativos ou não-circulativos e dependem da sua permanência na hemocele do vetor (Eigenbrode et al., 2018). Os fitopatógenos não-circulativos não ocupam a hemocele de seus vetores, mas se associam com partes do corpo como boca e intestino anterior, por meio da ligação de suas partículas a proteínas específicas nestes locais. De forma contrária, os fitopatógenos circulativos residem por algum tempo na hemocele do vetor, movendo-se das células do revestimento do

intestino para a própria hemocele, e das glândulas salivares para o hospedeiro vegetal durante a alimentação (Ng e Falk, 2006; Perilla-Henao e Casteel, 2016). Os fitopatógenos circulativos são ainda classificados como não-propagativos e propagativos, dependendo da replicação ou não dentro do organismo do vetor. Outra característica dos circulativos são seu alto grau de especificidade quanto ao vetor (Eigenbrode et al., 2018).

A interação fitopatógeno-vetor é categorizada em não-persistente, semi-persistente e persistente. Com isso, a transmissão dos fitopatógenos, especificamente dos vírus, depende de relações como o tempo exigido pelo vetor para adquirir o fitopatógeno e inoculá-lo, e o tempo que o vetor leva para reter as partículas do vírus (Szczepaniec e Finke, 2019). Em geral, os vírus não-persistentes têm curto tempo de retenção (variando de minutos a poucas horas), que é quanto o vetor permanece capaz de transmitir o vírus após sua aquisição. Por outro lado, a transmissão semi-persistente ocorre quando o tempo de retenção do vírus pelo vetor varia de horas a alguns dias. Oposto aos anteriores, os vírus persistentes são retidos por tempo indefinido, concedendo a capacidade de transmissão pelo resto da vida de seu vetor (Ng e Falk, 2006). A dinâmica populacional da dispersão, escolha do hospedeiro e a alimentação do vetor são extremamente importantes na epidemiologia das doenças de plantas (Eigenbrode et al., 2018). Considerando os aspectos evolutivos, para que a disseminação do fitopatógeno seja abrangente, é vantajoso que o desempenho e o comportamento de seu vetor também sejam beneficiados (Eigenbrode et al., 2018). Por esse motivo, grande parte dos patógenos causadores de doenças relevantes na agricultura dependem estritamente da relação com seu vetor (Hogenhout et al., 2008; Nachappa et al., 2020).

Dentre os diversos patossistemas existentes no ambiente agrícola, o patossistema leprose se destaca por possuir características que destoam dos demais. Estudos recentes demonstraram que a relação entre o vírus, ácaro-vetor e planta é altamente incomum, já que o CiLV-C é uma infecção que permanece restrita apenas aos locais de alimentação de *B. yothersi* virulíferos, tendo seu processo de transmissão ainda não totalmente elucidado (Pascon et al., 2006; Tassi et al., 2017). Quando realizados experimentos envolvendo *A. thaliana*, foi comprovado que ácaros *B. yothersi* que não possuíam CiLV-C induziram as vias de SA e JA, enquanto os que

possuíam o vírus, reprimiram a via do JA. Além disso, a população de ácaros em plantas infectadas pelo CiLV-C foi superior à de plantas que estavam isentas do vírus da leprose, demonstrando que o CiLV-C é capaz de induzir mudanças no comportamento de seu vetor (Arena et al., 2016). Ao avaliarem os mecanismos moleculares de defesa envolvidos na interação entre *A. thaliana* e *B. yothersi*, pesquisadores também descobriram que existe uma drástica reprogramação transcricional das plantas quando estas estão colonizadas com os ácaros, sugerindo que estes artrópodes possuem a capacidade de manipular o mecanismo de defesa da planta em questão ao seu favor (Arena et al., 2018).

2.5. O mecanismo de defesa vegetal

As interações existentes entre planta-vetor-fitopatógeno na agricultura são complexas e exigem estudos detalhados para sua melhor compreensão (Walling, 2000; Howe e Schaller, 2008). Ao longo de 350 milhões de anos de coevolução planta-artrópode, estes organismos desenvolveram diferentes habilidades comportamentais. Por exemplo, determinados artrópodes fitófagos adquiriram hábitos alimentares mastigadores ou sugadores, e como consequência as plantas adaptaram suas respostas defensivas de acordo com a natureza da injúria sofrida (Hogenhout e Bos, 2011). Em resposta, alguns destes organismos ao se alimentarem, podem secretar proteínas em sua saliva que modulam ou até mesmo reprimem a resposta defensiva das plantas sob ataque (Kant et al., 2015). A maquinaria de defesa torna-se então, uma importante ferramenta de sobrevivência das plantas, visto que elas não podem se mover ou fugir dessas ameaças (Dangl e Jones, 2001).

Para resistir as adversidades do ambiente e manter a sobrevivência da espécie, plantas desenvolveram um aprimorado sistema de defesa. Barreiras físicas como tricomas, cutículas e espinhos, que compõem parte deste sistema, são chamados defesas constitutivas (Walling 2000; Wu e Baldwin 2010). Além disso, tanto os insetos mastigadores quanto os sugadores e ácaros, ao ultrapassarem essas barreiras, precisam lidar com os metabólitos secundários das plantas, que incluem a produção de inibidores de protease, alcaloides e glicosídeos cianogênicos, que funcionam como suas armas químicas (Dangl e Jones 2001; Wu e Baldwin 2010).

Além das defesas constitutivas, que são intrínsecas às plantas, outras podem ser estimuladas por mudanças abióticas (temperatura, umidade, estresse hídrico) ou bióticas (insetos, fitopatógenos). Estas são as defesas induzidas, que dependem em sua maioria da detecção e do reconhecimento do organismo prejudicial (Karban e Myers 1989; Howe e Schaller 2008).

O sistema de defesa induzida é composto por receptores de reconhecimento de padrões (*plant pattern recognition receptors* - PRR), que são capazes de reconhecerem partículas associadas a microrganismos (*microbial-associated molecular patterns* – MAMP), a fitopatógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMP) e a herbívoros (*herbivore-associated molecular patterns* – HAMP), resultando na imunidade desencadeada por padrões (*pattern-triggered immunity* - PTI) (Wu e Baldwin, 2010; Hogenhout e Bos, 2011).

Muitas vezes, o organismo prejudicial pode suprimir a PTI ao produzir proteínas efetoras, ferramenta conquistada graças a sua co-evolução junto à planta hospedeira, o que leva à susceptibilidade desencadeada pelo efetor (*effector-triggered susceptibility* - ETS). As plantas então, como nova forma de defesa, codificam proteínas que reconhecem direta ou indiretamente os efetores, por meio de genes de resistência (R), ativando a imunidade desencadeada pelo efetor (*effector-triggered immunity* - ETI) (Dangl e Jones, 2001; Hogenhout e Bos, 2011).

Alguns elementos que regulam as defesas induzidas por herbívoros e fitopatógenos são o ácido jasmônico (JA), o etileno (ET), as espécies reativas de oxigênio (ROS), os fluxos de íons Ca^{2+} e as proteínas quinases ativadas por mitogênio (*mitogen-activated protein kinases* - MAPK), além da indução da via de ácido salicílico (SA), produção de metabólitos secundários antimicrobianos, síntese de calose e indução de quitinases e glucanases, que são as proteínas de defesa relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins* - PR) (Wu e Baldwin, 2010). Ao sofrerem injúrias causadas por artrópodes ou fitopatógenos as plantas podem ativar defesas como a resposta de hipersensibilidade (*hypersensitive response* - HR), onde as células ao redor da infecção morrem, e se inundam por compostos antimicrobianos a fim de evitar a propagação do fitopatógeno (Lam et al., 2001). Se houver a presença de genes R nesta planta, o processo que a sucede tende a ser a explosão de ROS, que contribui para a morte celular programada (Kessler e Baldwin, 2002).

2.6. Hormônios envolvidos no mecanismo de defesa vegetal

Pequenos insetos sugadores e ácaros, ao se alimentarem do conteúdo celular por meio da inserção de seus estiletes na superfície da planta, ocasionam injúrias diferentes quando comparados a artrópodes mastigadores (Cranham et al., 1985). Dado esse hábito, podem induzir as defesas das plantas, ativando as vias de sinalização do ácido jasmônico (JA) e do ácido salicílico (SA) (Walling, 2000). Normalmente, esses hormônios são essenciais para coordenar e desencadear os mecanismos de defesa das plantas, após a ativação do sistema imune (Mysore e Ryu, 2004).

Muitos compostos estudados após a descoberta do metil jasmonato (MeJA), um metabólito secundário de óleos essenciais de jasmim (Demole et al., 1962), foram amplamente considerados como jasmonatos (Schaller e Stintzi, 2008). O JA é uma molécula de sinalização derivada de ácido graxo, e sua principal função no desenvolvimento vegetal é a resistência a estresses bióticos, atuando de forma minimamente efetiva no crescimento da planta (Kunkel e Brooks, 2002). Diversos estudos demonstram que o JA é um hormônio essencial no controle da defesa das plantas contra herbívoros, mediando grande parte das respostas induzidas por ferimentos e herbivoria. A regulação de seu acúmulo, seguida da sua sinalização após a detecção de ferimentos ou herbivoria, é extremamente importante para que a planta reaja habilmente (Wu e Baldwin, 2010).

O etileno (ET) regula uma ampla gama de processos fisiológicos no desenvolvimento das plantas, além de participar das defesas a estresses bióticos e abióticos. As plantas ativam rapidamente a biossíntese do ET após o reconhecimento do ataque de herbívoros, induzindo uma explosão do fitohormônio em quantidades muito maiores do que aquelas induzidas por ferimentos mecânicos. No entanto, sua função é atuar principalmente no ajuste de respostas induzidas por JA (Kunkel e Brooks, 2002; Wu e Baldwin, 2010).

Para a biossíntese de SA, são necessárias duas enzimas chave: a fenilalanina amônia liase (PAL) e a isocorismato sintase (ICS) (Walling 2000). O SA é fundamental para o estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR), um estado de defesa intensificada, que é ativado nas plantas após

a infecção primária por fitopatógenos que provocam injúrias ao tecido local. Desse modo, o SA atua na defesa central das plantas contra fitopatógenos, fazendo com que seus níveis nas células vegetais aumentem após a detecção de uma infecção, e alcancem uma ampla gama de possíveis invasores. Para a rápida ativação de respostas de defesa mediadas por genes de resistência, além da indução da defesa local, é extremamente importante a presença do SA (Ryals et al., 1996; Kunkel e Brooks, 2002).

Estudos moleculares descreveram que a via do SA pode atuar na resposta a estímulos de herbívoros que causam injúrias mínimas, como perfuração do tecido vegetal (Walling, 2000). Por outro lado, a via do JA é dividida em dois ramos antagônicos e interconectados, que são ativados pelas plantas como resposta a estímulos distintos. O ramo de fator responsivo ao etileno (ERF) se comunica de forma sinérgica com a via do ET, como resposta a invasores biotróficos ou necrotróficos. O ramo que é controlado por fatores de transcrição MYC (proteína reguladora de genes) é independente do ET e ativa a defesa contra herbívoros que causam grandes injúrias ao tecido vegetal (Pieterse et al., 2012; Schmiesing et al., 2016). Essas características defensivas das plantas não se restringem apenas ao local do ataque sofrido, seja ele por um inseto ou fitopatógeno, estendendo-se sistemicamente para suas outras partes (Howe e Schaller, 2008). As vias de sinalização de SA e JA são mutuamente antagônicas. Para tanto, é fundamental que as plantas tenham a indução de suas defesas ajustadas de acordo com as injúrias sofridas, sejam elas por herbívoros ou fitopatógenos (Kunkel e Brooks 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais dos trabalhos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Acarologia – GEMAN (Grupo de Estratégias e Manejo de Ácaros Neotropicais), pertencente à Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal (Unesp/FCAV). As análises moleculares para detecção de CiLV-C em ácaros, extração de RNA vegetal e a análise de expressão gênica foram realizados

na Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada, localizada no Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

3.2. Colônia de ácaros *Brevipalpus yothersi* avirulíferos

A população de ácaros avirulíferos (isentos de CiLV-C) foi proveniente de uma criação estabelecida em laboratório por várias gerações. Para tanto, fêmeas adultas de *B. yothersi* foram transferidas para frutos de lima-ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka) sem resíduos de agrotóxicos, provenientes de plantas saudáveis. A lima-ácida foi utilizada por apresentar imunidade ao CiLV-C (Arena et al., 2016), garantindo que os ácaros ali presentes não adquirissem o vírus. A população obtida foi mantida em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e 12 horas de fotofase), em frutos parcialmente parafinados, com uma arena sem parafina circundada por fina camada de cola entomológica (Cola Tatoon®, Isca Tecnologias, Ijuí, RS, Brasil), para impedir a fuga dos ácaros, conforme metodologia adaptada de Chiavegato (1986). Dada a preferência de *Brevipalpus* spp. por superfícies irregulares (Bitancourt e Jenkins, 1936), foi pincelada no centro de cada arena uma mistura de areia fina, gesso, farinha de trigo e água, onde fêmeas adultas foram transferidas com auxílio de um pincel com apenas um pelo sob microscópio estereoscópico (Zeiss® Stemi DV4) (Rodrigues et al., 2007) (Figura 1).

3.3. Colônia de ácaros *Brevipalpus yothersi* virulíferos

A população de ácaros virulíferos para o CiLV-C também foi proveniente de uma criação estabelecida em laboratório por várias gerações. Para tanto, fêmeas adultas de *B. yothersi* foram transferidas para frutos de laranja doce (*C. sinensis*) com sintomas de leprose dos citros e sem resíduos de agrotóxicos. Os frutos com sintomas da doença foram utilizados para garantir a aquisição do vírus pelos ácaros através da alimentação. A população obtida foi mantida como descrito anteriormente para criação de *B. yothersi* avirulíferos (Figura 1).

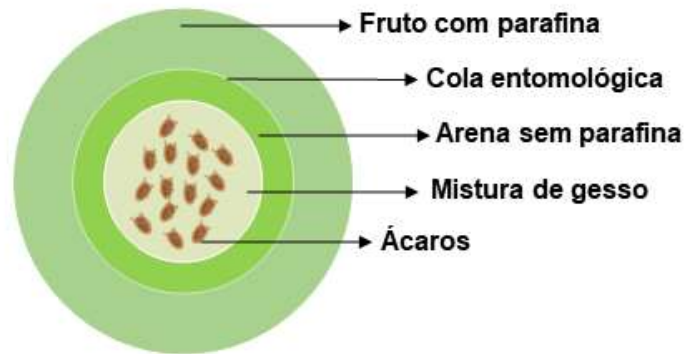


Figura 1. Método utilizado para criação de ácaros avirulíferos e virulíferos.

3.4. Detecção de CiLV-C em ácaros por RT-PCR

A presença e a ausência do CiLV-C em ácaros virulíferos e avirulíferos, respectivamente, foi confirmada por análise de RT-PCR, de acordo com metodologia desenvolvida por Novelli et al. (2007). Inicialmente, amostras compostas por 10 ácaros de ambas as populações foram trituradas com auxílio de hastes de vidro. Para extração do RNA total, utilizou-se 50 µL de tampão CTAB [2% (p/v) de brometo de cetil trimetil amônio; 1,4 M NaCl; 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0] contendo beta-mercaptoetanol a 0,5% fresco, misturado e incubado a 55°C por 15 minutos. Cento e cinquenta (150) µL de álcool clorofórmio: isoamílico (24:1) foram adicionados a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e misturados com um vortex, seguido de centrifugação a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente removida para um novo microtubo. Foi realizada uma segunda extração com uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1. O sobrenadante foi recolhido em microtubos estéreis e 1/10 de volume de 7,5 M NH₄Ac e 1 volume de isopropanol foram adicionados, misturados por inversão e mantidos a -20°C por 15 min. A solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 150 mL de etanol a 70% preparado com água tratada DEPC, seco durante 5 minutos, ressuspensionado em 5 µL de água tratada DEPC, e armazenado a -80 °C.

Os cDNAs foram sintetizados usando iniciadores específicos desenvolvidos por Locali et al. (2003) para detecção do CiLV-C. As PCRs foram realizadas com tampão de reação 1 ×, 1,8 mM MgCl₂, 0,2 mM da mistura dNTP, 1 U de *Taq* DNA polimerase

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 200 nM de cada primer e água Milli-Q estéril para um volume final de 25 μ L. O cDNA de ácaros não virulíferos foi utilizado como controle negativo. Os produtos de PCR foram processados em géis de agarose a 1% (p/v) em 1 \times TAE e visualizados por coloração com brometo de etídio (Figura 2).

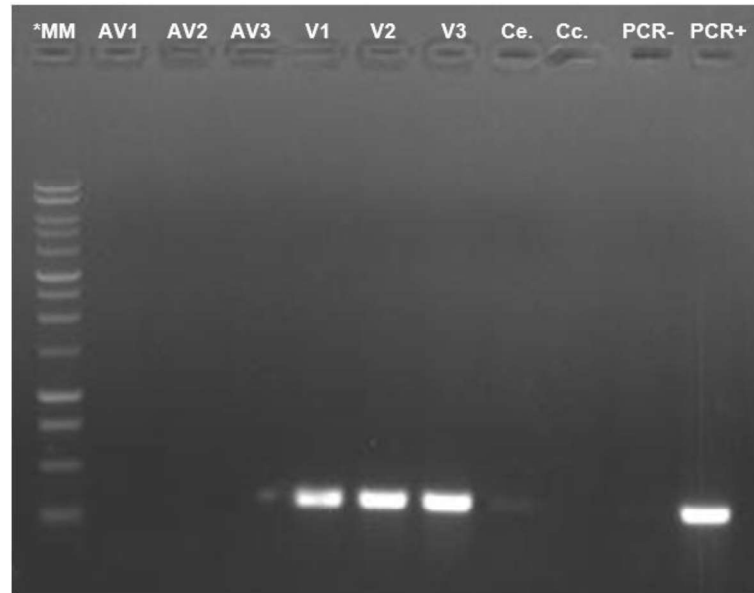


Figura 2. Detecção de CiLV-C em ácaros avirulíferos e virulíferos, por meio de análise de PCR em gel de agarose 1%. ***MM** = marcador molecular 1 kb; **AV** = ácaros avirulíferos; **V** = ácaros virulíferos; **Ce** = controle extração RNA; **Cc** = controle síntese cDNA; **PCR-** = controle PCR; **PCR+** = amostra positiva CiLV-C.

3.5. Instalação e execução dos experimentos

3.5.1. Experimento preliminar

Um experimento preliminar foi realizado utilizando-se plântulas de laranja-doce (*C. sinensis*) de aproximadamente 6 meses de idade obtidas a partir de sementes, para aperfeiçoamento da metodologia a ser utilizada. Para tanto, essas plântulas foram acondicionadas em tubetes plásticos de 25 cm³ contendo substrato inerte (Golden Mix granulado T11, Amafibra), e dispostas em sala climatizada (25 \pm 2°C; umidade relativa de 60 \pm 10%; 12 horas de fotofase), com irrigação uma vez ao dia ou quando necessário para manter o substrato úmido.

O experimento foi composto por três tratamentos com 15 repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo eles: plântulas sem a primeira infestação com ácaros (controle), plântulas com a primeira infestação de ácaros avirulíferos (tratamento 1); plântulas com a primeira infestação com ácaros virulíferos (tratamento 2) (Figura 3).

A primeira infestação foi realizada com a transferência de 15 fêmeas adultas de *B. yothersi* avirulíferos para as plântulas do tratamento 1, e 15 fêmeas de *B. yothersi* virulíferos adultas para as plântulas do tratamento 2, sendo que o tratamento controle não recebeu ácaros. Após 24 dias, tempo o suficiente para que os ácaros virulíferos inoculassem o CiLV-C e dessem origem a uma nova geração, os indivíduos da primeira infestação foram retirados das plântulas dos tratamentos 1 e 2 com auxílio de algodão embebido em água, garantindo que as mesmas estivessem isentas de ácaros remanescentes (Figura 3).

Quarenta e cinco (45) dias após a retirada dos ácaros da primeira infestação, as plântulas que receberam ácaros virulíferos (tratamento 2) manifestaram sintomas de leprose dos citros (Figura 3). Assim, foi realizada a segunda infestação com 15 fêmeas de *B. yothersi* avirulíferos para os tratamentos controle, 1 e 2. Após 28 dias da segunda infestação (tempo o suficiente para uma nova geração de ácaros) foi realizada a contagem de ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutoninfas) e adultos de *B. yothersi* em todos os tratamentos com auxílio de microscópio estereoscópio (Zeiss® Stemi DV4).

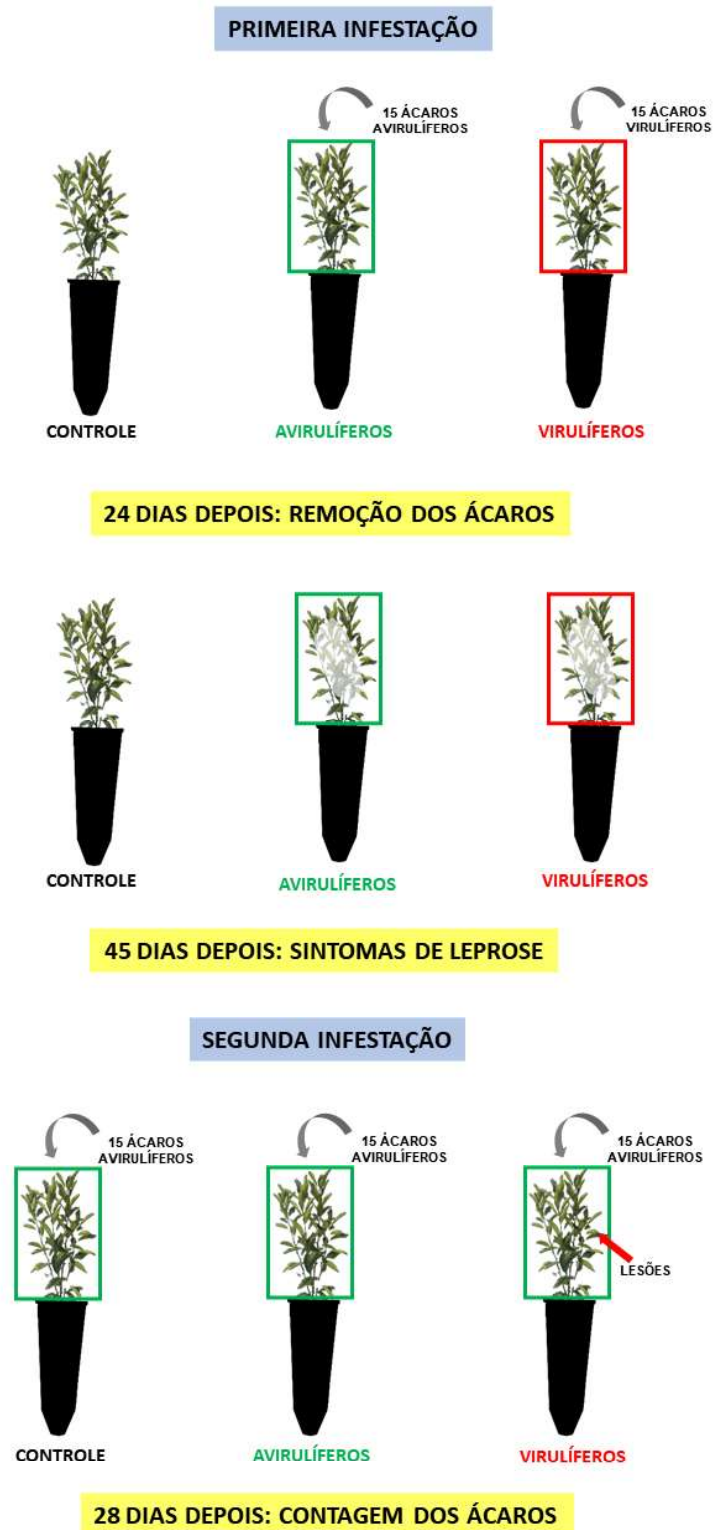


Figura 3. Detalhes do experimento preliminar com plântulas de laranja doce realizado em laboratório.

3.5.2. Experimento principal

O experimento principal foi realizado utilizando-se plantas de laranja-doce (*C. sinensis* var. Pera) enxertadas em limoeiro-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) com um ano de idade, isentas de resíduos de agrotóxicos. As plantas foram cultivadas em vasos de 5 L de capacidade contendo terra, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1, e mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental. Para instalação do experimento, as plantas foram previamente podadas, deixando-se apenas dois ramos por planta (ramo 1 e ramo 2) (Figura 4). A base de cada ramo foi circundada com uma fina camada de cola entomológica (Cola Tatoon®, Isca Tecnologias, Ijuí, RS, Brasil) para contenção dos ácaros *B. yothersi* transferidos posteriormente e para impedir o acesso de predadores.

O experimento foi composto por três tratamentos com 15 repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo: plantas sem a primeira infestação de ácaros (controle), plantas com a primeira infestação de ácaros avirulíferos (tratamento 1) e plantas com a primeira infestação de ácaros virulíferos (tratamento 2). Em um dos ramos (ramo 1), foi realizada a primeira infestação com 15 fêmeas adultas de *B. yothersi* avirulíferas (tratamento 1), 15 fêmeas adultas de *B. yothersi* virulíferas (tratamento 2) e as plantas do controle não receberam ácaros (Figura 4).

Após 30 dias das infestações iniciais, tempo o suficiente para que os ácaros virulíferos inoculassem o CiLV-C e dessem origem a uma nova geração, foi realizada a primeira coleta de amostras, tanto das plantas que receberam ácaros avirulíferos e virulíferos, quanto do controle (Figura 4). Para tanto, duas folhas de apenas um dos ramos (ramos 1) de cada planta foram recolhidas e individualizadas em envelopes de papel alumínio, e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido. As amostras foram posteriormente acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo seco, e encaminhadas para freezer com temperatura constante de -80°C.

Imediatamente após o processo de coleta, seguiu-se a pulverização de enxofre (Kumulus® DF; Basf SE, Baden-Württemberg – Alemanha) na dose de 500 g 100 L⁻¹ sobre as plantas de todos os tratamentos e do controle, para que os ácaros presentes não interferissem na segunda infestação. Para garantir que estivessem isentas de resíduos e de ácaros remanescentes, 10 dias após a aplicação do acaricida todas as suas folhas foram limpas com algodão embebido em água (Figura 4).

Posteriormente, foi pincelada sobre todas as folhas do controle e do tratamento que recebeu a primeira infestação com ácaros avirulíferos, uma mistura contendo gesso, areia, farinha de trigo (1:1:1) e água para simular irregularidades na superfície foliar, o que não foi feito no tratamento que recebeu a primeira infestação com ácaros virulíferos por já apresentar lesões de leprose. Foi realizada na mesma data uma nova transferência de ácaros somente avirulíferos para todos os tratamentos incluindo o controle, sendo utilizados nessa ocasião os dois ramos de cada planta (ramo 1 e ramo 2), com 15 fêmeas adultas transferidas para cada ramo (Figura 4).

Após 35 dias da segunda transferência de ácaros avirulíferos (tempo o suficiente para uma nova geração de ácaros), procedeu-se uma nova coleta. Foram coletadas duas folhas dos dois ramos de cada uma das plantas do controle, e dos tratamentos, seguindo o mesmo método utilizado na primeira coleta. As amostras obtidas em ambas as coletas foram utilizadas para a análise dos genes marcadores da via do ácido salicílico (gene *PR1*), e do ácido jasmônico (gene *PR4*) das plantas de laranja doce, durante sua interação com os ácaros e o CiLV-C.

Ao final do experimento, foram removidos os ramos das plantas com tesoura de poda, e encaminhados ao laboratório para contabilização do número total de ovos, larvas, ninfas (protoninfas + deutoninfas) e adultos de *B. yothersi*, com auxílio de um microscópio estereoscópio (Zeiss® Stemi DV4).

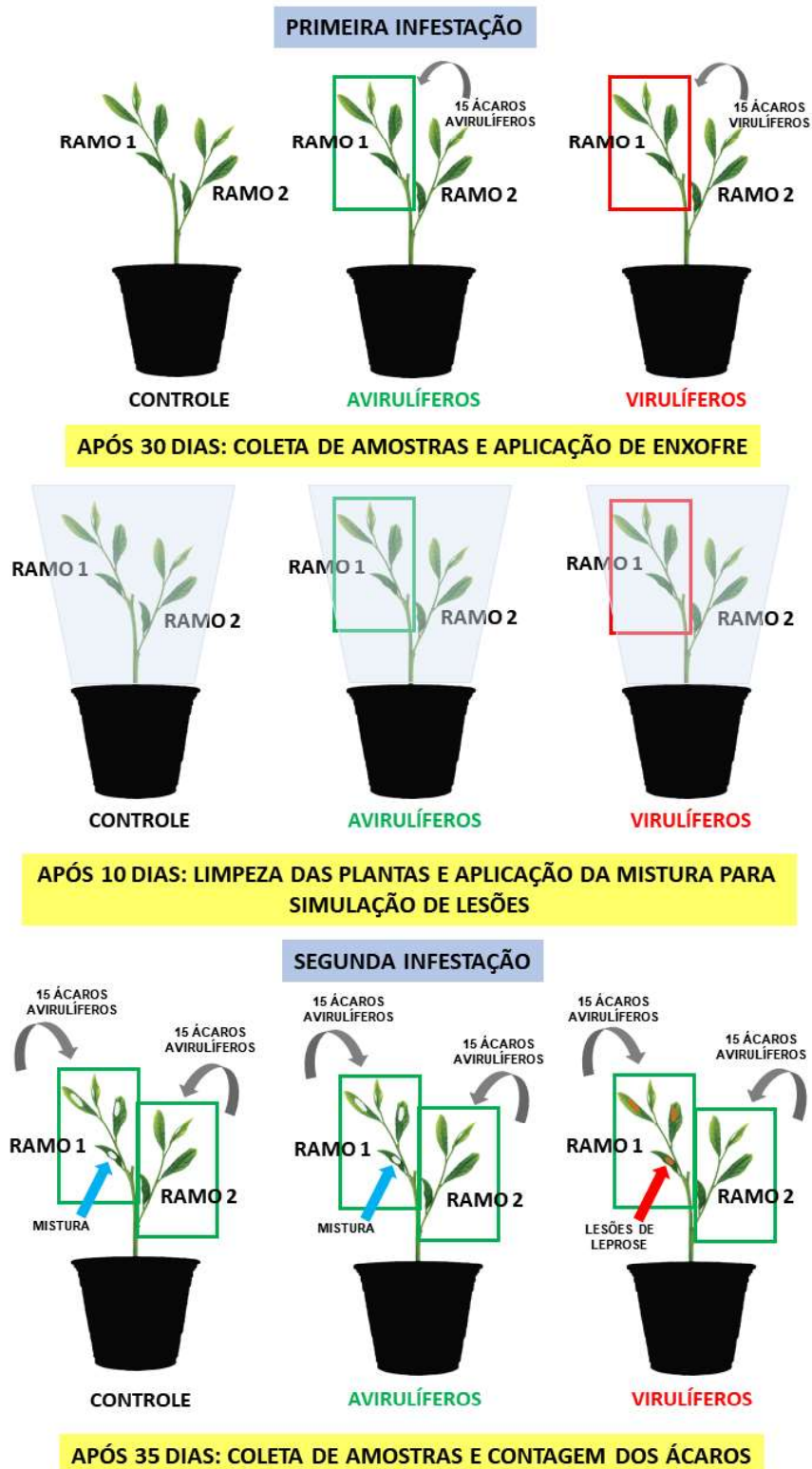


Figura 4. Detalhes do experimento principal realizado em casa de vegetação. A mistura utilizada antes da segunda aplicação foi gesso, areia, farinha de trigo (1:1:1) e água.

3.6. Avaliação dos genes marcadores das vias de ácido salicílico (*PR1*) e ácido jasmônico (*PR4*) em *Citrus sinensis*

3.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA vegetal obtido das amostras foi purificado a partir de aproximadamente 100 mg de folhas anteriormente coletadas, utilizando o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Holanda). O DNA residual da planta foi removido por DNase livre de RNase (Qiagen, Venlo, Holanda) durante a extração do RNA. A quantificação do RNA e as proporções A260/A280 foram estimadas utilizando-se um micro espectrofotômetro Nano Drop ND-8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O cDNA correspondente de cada amostra (700 ng de RNA total) foi gerado utilizando o RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), conforme descrito pelo fabricante. As soluções de cDNA foram diluídas 25 vezes em água livre de RNase para análise subsequente por qPCR.

3.6.2. Análise de expressão gênica

Os níveis de expressão dos genes relacionados à defesa da planta foram avaliados por RT-qPCR, sendo que todas as sequências de *primers* foram obtidas na literatura (Tabela 1). As misturas para RT-qPCR foram preparadas para um volume final de 25 μ L, com 10 μ L de GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 120 ou 150 nM de pares de primers específicos para cada gene, e 3 μ L do cDNA diluído. As amplificações foram realizadas em aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando de ciclagem padrão: 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, e 60°C por 30 segundos. Cada amostra foi analisada em triplicata. Para confirmar a ausência de DNA genômico e reações inespecíficas, as curvas de dissociação de cada reação foram inspecionadas e três controles livres de cDNA foram incluídos para cada par de primer. Em seguida, a eficiência do primer e o valor de quantificação do ciclo foram determinados para RT-qPCR individualmente, utilizando o algoritmo do Real-time PCR Miner (Zhao e Fernald, 2005). Seguiram-se então as análises de expressão

gênica, realizadas de acordo com o modelo ΔCq usando vários genes de referência (Hellemans et al., 2007). O valor de eficiência (E) de cada par de primers foi estimado como a média aritmética dos valores de todas as amostras. O valor Cq de cada amostra, expresso como a média das três repetições técnicas, foi convertido em quantidades relativas (RQ) usando a função $RQ = E^{\Delta Cq}$, onde ΔCq é a diferença entre o menor valor de Cq em todas as amostras para o gene avaliado, e o valor Cq de uma determinada amostra. A quantidade relativa normalizada (NRQ) de cada amostra foi calculada como a razão entre a RQ do gene alvo e a RQ do gene de referência correspondente.

Tabela 1. Genes selecionados e sequências de primers utilizados para as análises de expressão gênica de *Citrus sinensis* por RT-qPCR.

Gene	Sequência	Referência
SAND (normalizador)	F: AGGTTGTCAGCCTTGTTGG R: GCCGTGGGATTATATCTTGG	(Mafra et al., 2012)
PR1 (via do ácido salicílico)	F: AAATGTGGGTGAATGAGAAAGC R: ATTATTGTTGCACGTCACCTTG	(Mafra et al., 2013)
PR4 (via do ácido jasmônico)	F: GGAGGTTCGGTCTTTGTGTGATT R: TTGTCCAATGGGTCCGCCGAAT	(Tang et al., 2021)

3.7. Análise dos dados

Os dados populacionais obtidos no experimento preliminar, foram submetidos aos testes de Bartlett para constatação de homocedasticidade (PROC GLM) e de Cramer Von Mises para normalidade (PROC UNIVARIATE). Por apresentarem tais requisitos foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas entre si utilizando o teste de Tukey a 5% ($p > 0,05$) por meio do software SAS (SAS Institute 2015).

Com base no número de ácaros obtido em cada unidade do experimento preliminar, foi determinada a taxa instantânea de crescimento (r_i) da população, utilizando-se a fórmula proposta por Stark e Banks (2003):

$$ri = \ln(Nf / No) / \Delta t$$

onde: Nf = número total de ácaros (ovos, larvas, ninfas, fêmeas e machos) obtidos aos 28 dias, No = número de fêmeas transferidas para as unidades experimentais e Δt = intervalo de tempo (em dias) transcorrido entre a transferência das fêmeas para as unidades experimentais e a avaliação final. Valores positivos e negativos de ri indicam incremento e decréscimo populacional, respectivamente, enquanto valores de $ri = 0$ indicam que a população se manteve estável durante o período de avaliação.

Os dados populacionais obtidos no experimento principal foram submetidos aos mesmos testes que o experimento preliminar, por meio do software SAS (SAS Institute 2015). Com base no número de ácaros obtido em cada unidade experimental, também foi determinada a taxa instantânea de crescimento (ri) da população, utilizando-se a fórmula proposta por Stark e Banks (2003), onde: Nf = número total de ácaros (ovos, larvas, ninfas, fêmeas e machos) obtidos aos 35 dias após a segunda infestação.

Os valores dos níveis de expressão dos genes *PR1* e *PR4* foram submetidos aos mesmos testes dos experimentos anteriores, por meio do software SAS (SAS Institute 2015).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento preliminar

O número de ovos, larvas, ninfas e o total de ácaros não diferiram entre os tratamentos (F = 0,17; p = 0,8481, para ovos; F = 0,02; p = 0,9825, para larvas; F = 0,43; p = 0,6548, para ninfas; e F = 0,18; p = 0,8370, para total de ácaros). Não foram encontrados ácaros adultos em nenhum dos tratamentos. Não houve diferença significativa quanto a taxa instantânea de crescimento (ri) (F = 2,49; p = 0,0953).

4.2. Experimento principal

4.2.1. Influência da primeira infestação e das lesões artificiais (mistura de gesso) e naturais (leprose)

A primeira infestação com ácaros (avirulíferos e virulíferos), além das lesões artificiais (mistura de gesso) e naturais (leprose) no ramo 1 das plantas de cada tratamento, influenciaram positivamente no crescimento populacional de *B. yothersi*. Verificou-se que a primeira infestação com ácaros (Ramos 1) aumentou a taxa de oviposição de *B. yothersi* ($F = 6,36$; $p = 0,0027$) e o número de larvas ($F = 3,20$; $p = 0,0457$), mas não influenciou na quantidade de ninfas ($p > 0,05$). O número de adultos foi maior em plantas que receberam a primeira infestação ($F = 15,81$; $p < 0,0001$) (Figura 5).

Ramos que não receberam a primeira infestação (Ramos 2), não apresentaram diferença quanto ao número de ovos ($F = 1,91$; $p = 0,1546$). O mesmo padrão também foi observado para a quantidade de larvas ($F = 2,63$; $p = 0,0782$) e ninfas ($p > 0,05$). Além disso, o número de ácaros adultos também não diferiu entre os três tratamentos que não receberam a primeira infestação ($p > 0,05$) (Figura 5).

Comparando os ramos 1 e 2 de cada tratamento, a presença de lesões contribuiu para aumento do número de ovos, larvas, ninfas e adultos, tanto em avirulíferos (mistura de gesso) quanto virulíferos (lesões naturais de leprose) ($p > 0,05$). No controle, este mesmo fato foi observado apenas para o número de larvas ($F = 5,81$; $p = 0,0181$) e ninfas ($F = 4,28$; $p = 0,0417$). Para as demais fases, a presença de lesões não favoreceu o aumento da população ($p > 0,05$) (Figura 5).

O coeficiente de correlação (r) entre a presença de lesão (mistura de gesso ou leprose) e o número de ácaros em todos os tratamentos foi positivo e forte (avirulíferos $r = 0,9942$, virulíferos $r = 0,9959$ e controle $r = 0,9890$).

De forma geral, a média da taxa instantânea de crescimento (ri) de *B. yothersi* 35 dias após a segunda infestação foi positiva para todos os tratamentos (Figura 6). No entanto, o ri foi maior em plantas que receberam a primeira infestação com ácaros virulíferos (lesões de leprose). Além disso, a presença de lesões de leprose favoreceu maior ri no tratamento virulíferos, quando comparado ao controle (Figura 6).

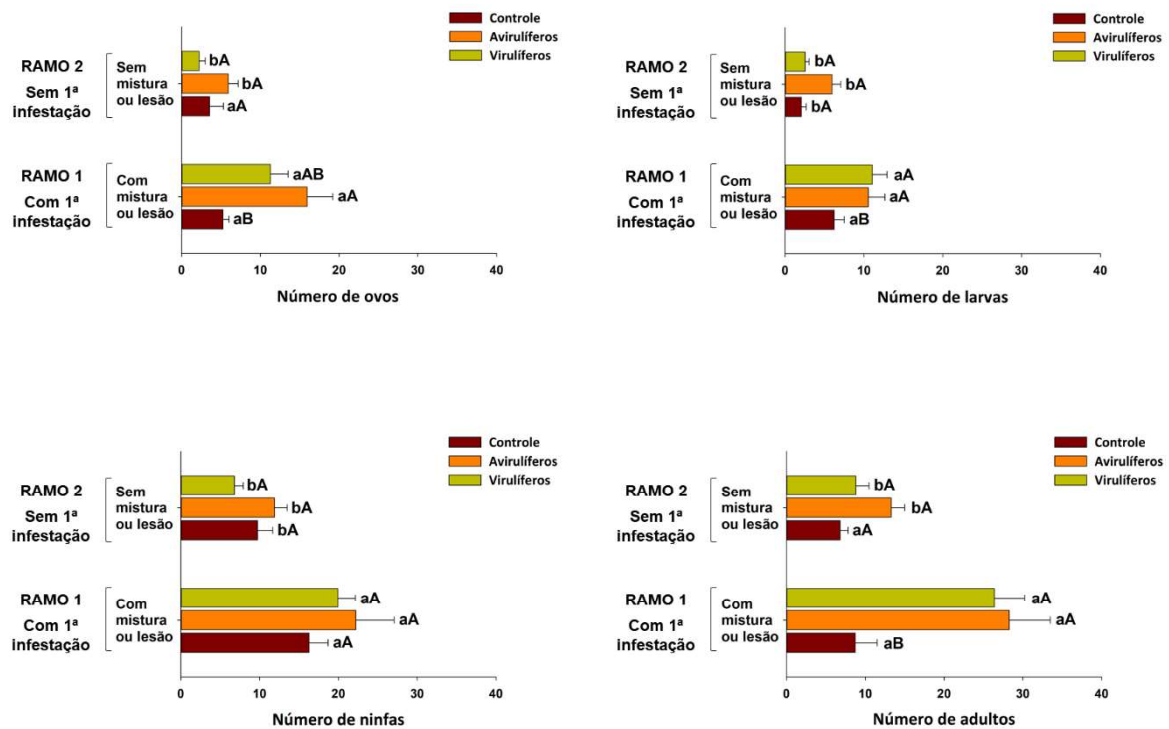


Figura 5. Influência da primeira infestação e das lesões artificiais e naturais no número de ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutoninfas) e adultos de *Brevipalpus yothersi* nos tratamentos controle, avirulíferos e virulíferos, após 75 dias da primeira infestação, e 35 dias da segunda infestação. Os ramos 1 de cada planta receberam a primeira infestação de ácaros avirulíferos e a mistura de gesso, e a primeira infestação de ácaros virulíferos com posterior aparecimento de lesões de leprose. Os ramos 2 ficaram isentos da primeira infestação de ácaros, mistura de gesso e aparecimento de sintomas de leprose. *Letras minúsculas comparam com e sem mistura/lesão dentro de cada tratamento, e letras maiúsculas comparam com e sem mistura/lesão entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

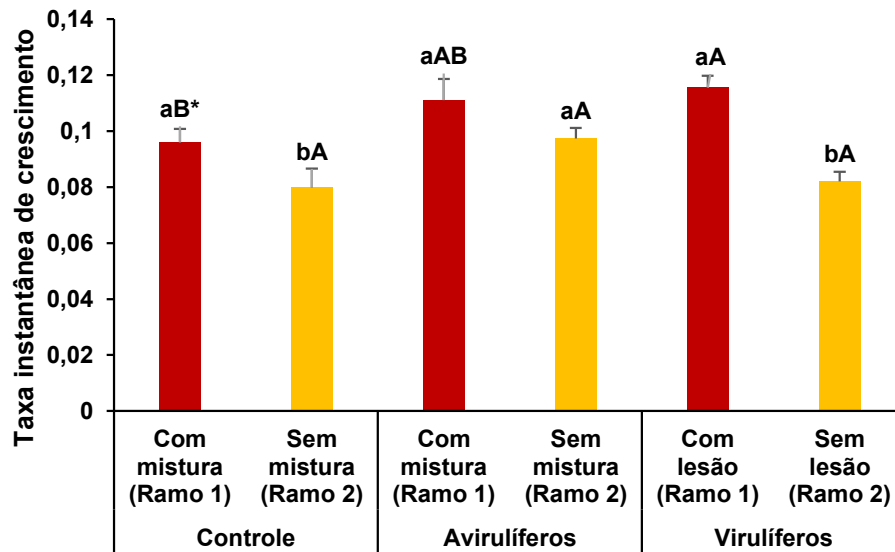


Figura 6. Taxa instantânea de crescimento (r_i) de *Brevipalpus yothersi* após 35 dias de transferência no controle, e nos tratamentos avirulíferos e virulíferos, com e sem presença de mistura ou lesão. Os ramos 1 de cada planta receberam a primeira infestação de ácaros avirulíferos e a mistura de gesso, e a primeira infestação de ácaros virulíferos com posterior aparecimento de lesões de leprose. Os ramos 2 ficaram isentos da primeira infestação de ácaros, mistura de gesso e aparecimento de sintomas de leprose. *Letras minúsculas comparam com e sem mistura ou lesão dentro de cada tratamento, e maiúsculas comparam com e sem mistura ou lesão entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

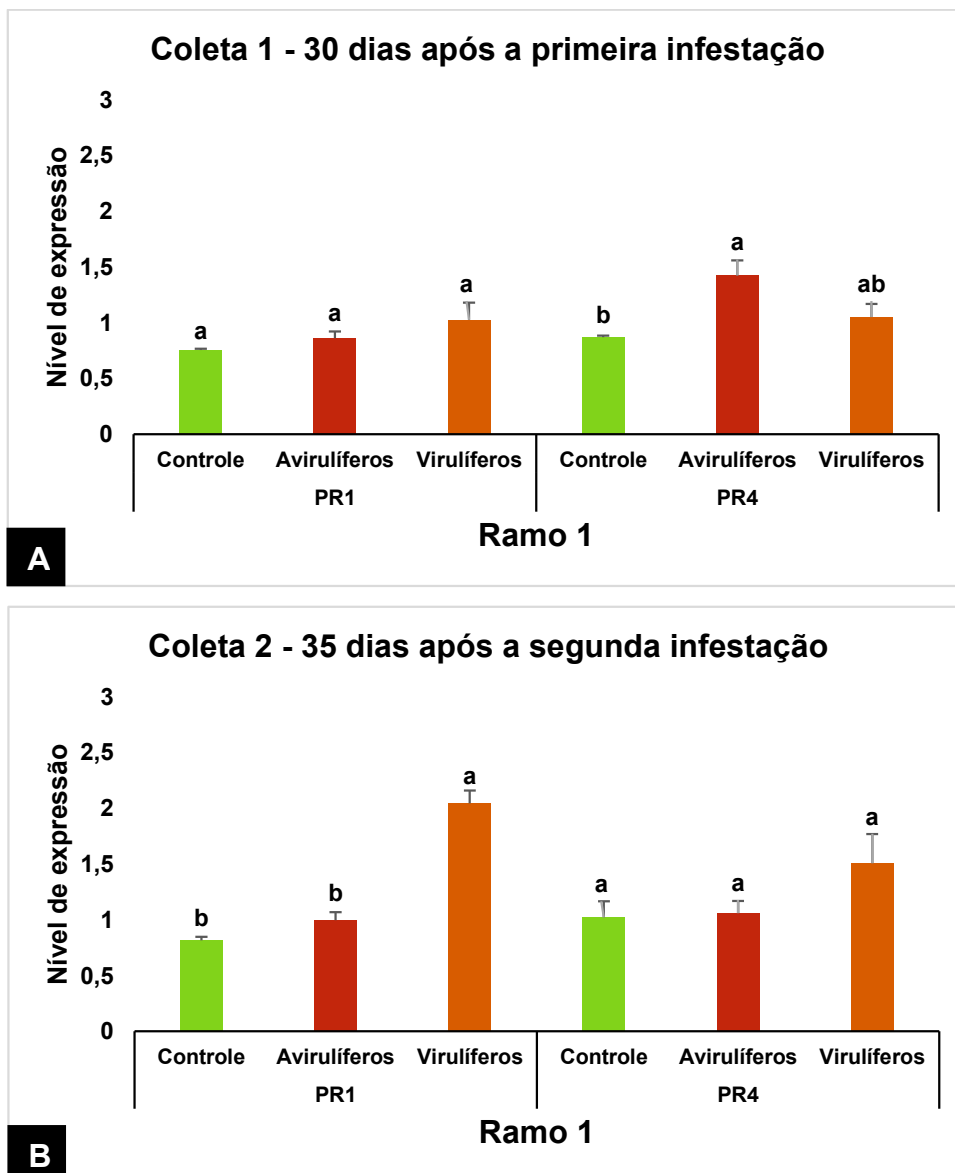
4.1.2. Análise de expressão gênica

A avaliação dos genes marcadores das vias de ácido salicílico (*PR1*) e ácido jasmônico (*PR4*) em *C. sinensis* foi realizada apenas para o experimento principal.

Na primeira coleta de amostras (apenas ramo 1, 30 dias após a primeira infestação), os níveis de expressão do gene *PR1* (via do ácido salicílico) não diferiu entre os tratamentos ($F = 2,08$; $p = 0,1671$). Contudo, os níveis de expressão do gene *PR4* (via do ácido jasmônico) diferiram no tratamento avirulíferos quando comparado com o controle e virulíferos ($F = 7,34$; $p = 0,0083$) (Figura 7A).

Na segunda coleta (35 dias após a segunda infestação), as plantas do tratamento virulíferos, infectadas por CiLV-C, apresentaram aumento nos níveis de

expressão do gene *PR1* ($F = 66,86$; $p < 0,0001$) (Figura 7B). Diferentemente, os níveis de expressão do gene *PR4* não diferiram entre os tratamentos ($F = 2,20$; $p = 0,1539$). As plantas que não receberam a primeira infestação com ácaros, na segunda coleta (ramo 2, 35 dias após a segunda infestação), não apresentaram diferença nos níveis de expressão do gene *PR1* ($F = 0,70$; $p = 0,5152$). Da mesma forma, os níveis de expressão do gene *PR4* também não diferiram entre os tratamentos ($F = 0,13$; $p = 0,8824$) (Figura 7C).



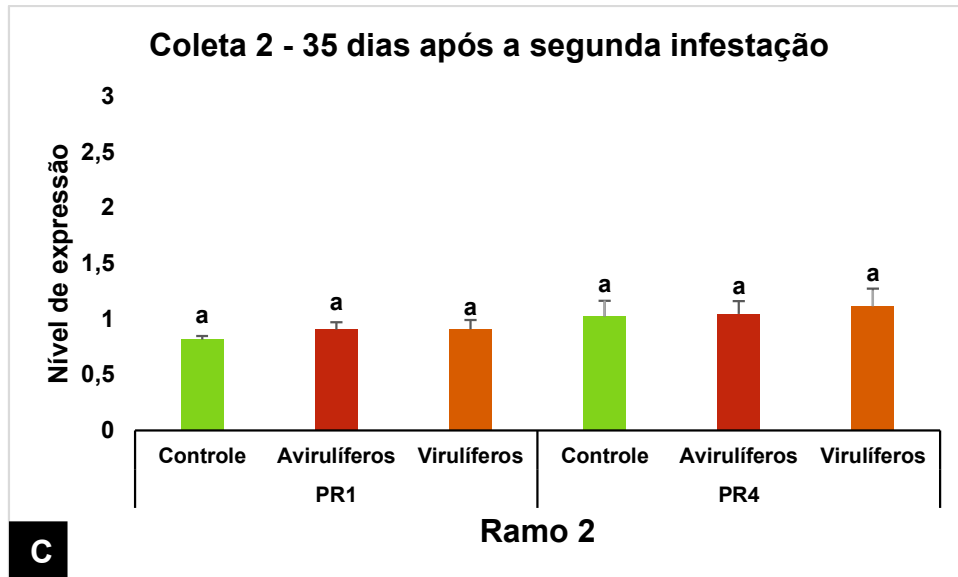


Figura 7. Níveis de expressão dos genes PR1 e PR4 nos tratamentos controle, avirulíferos e virulíferos, de acordo com a ordem de coleta (30 dias após a primeira infestação e 35 dias após a segunda infestação, respectivamente) e ramo correspondente. **A** = Primeira coleta, ramo 1; **B** = Segunda coleta, ramo 1; **C** = Segunda coleta, ramo 2. *Médias dos níveis de expressão de cada gene seguidas da mesma letra dentro de cada coleta e ramo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando os níveis de expressão de *PR1* no controle (ramo 1), entre a primeira (30 dias após a primeira infestação) e segunda coleta (35 dias após a segunda infestação), observou-se que não houve diferença significativa ($F = 0,23$; $p = 0,6342$), assim como nos níveis de expressão de *PR4* ($F = 0,52$; $p = 0,4763$) (Figura 8). No tratamento avirulíferos (ramo 1), não houve diferença entre os níveis de *PR1* entre as duas coletas, nem mesmo para *PR4* ($F = 1,13$; $p = 0,2983$; $F = 3,00$; $p = 0,0959$, respectivamente) (Figura 8). Por outro lado, no tratamento virulíferos os níveis de expressão de *PR1* ($F = 65,90$; $p < 0,0001$) e *PR4* foram maiores na segunda coleta do que na primeira ($F = 4,73$; $p = 0,0398$) (Figura 8).

Entre os tratamentos, os níveis de expressão do gene *PR1* na primeira coleta não apresentaram diferença ($F = 2,42$; $p = 0,1106$). Porém, para os níveis de *PR4* ($F = 3,59$; $p = 0,0431$) foi observada diferença entre os tratamentos da primeira coleta (Figura 8). Na segunda coleta, houve diferença nos níveis de *PR1* entre os

tratamentos ($F = 56,20$; $p < 0,0001$), principalmente virulíferos. O mesmo fato não foi observado em *PR4*, quando realizada a comparação entre os tratamentos ($F = 3,32$; $p = 0,0535$) (Figura 8).

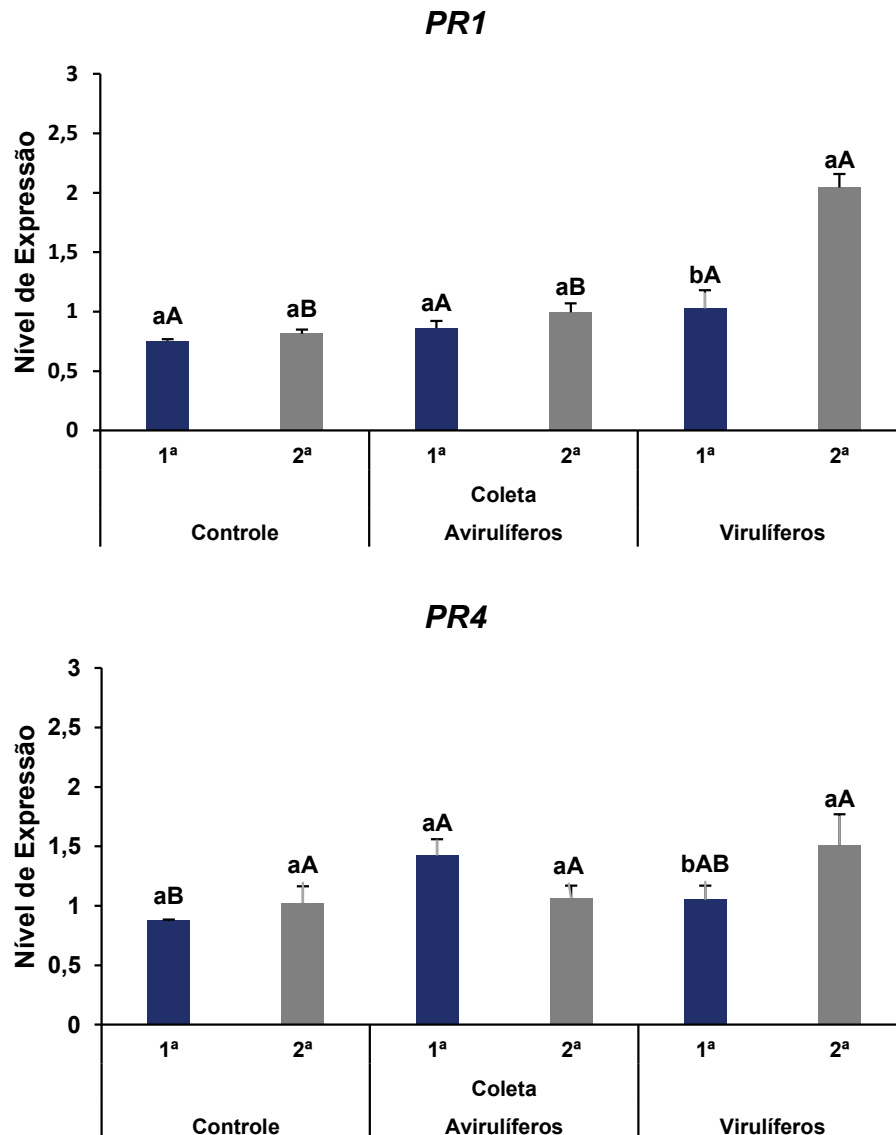
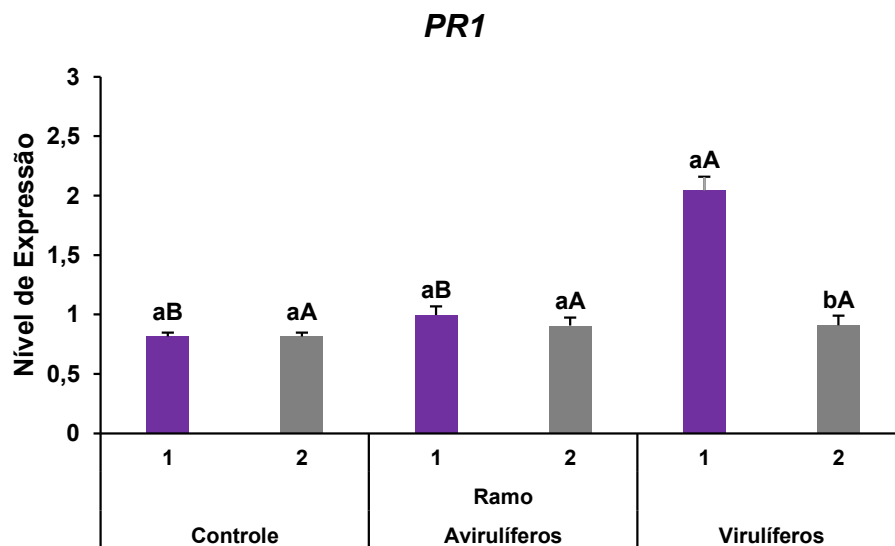


Figura 8. Comparação dos níveis de expressão dos genes *PR1* e *PR4* do ramo 1, entre a primeira (30 dias após a primeira infestação) e segunda coleta (35 dias após a segunda infestação), e entre os tratamentos. *Letras minúsculas comparam primeira e segunda coleta dentro de cada tratamento e gene, e maiúsculas comparam o gene em cada coleta entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando os níveis de expressão de *PR1* e de *PR4* entre os ramos 1 e 2, não foi observada diferença significativa na segunda coleta (35 dias após a segunda infestação) do controle ($F = 0,00$; $p = 0,9943$; $F = 0,00$; $p = 0,9962$, respectivamente) (Figura 9). Semelhantemente ao controle, o tratamento avirulíferos não apresentou diferença quando comparados os níveis de *PR1* e de *PR4* entre os ramos 1 e 2 ($F = 0,76$; $p = 0,3913$; $F = 0,00$; $p = 0,9491$, respectivamente) (Figura 9).

No tratamento virulíferos, houve diferença nos níveis de *PR1* quando comparados os ramos 1 e 2 ($F = 120,99$; $p < 0,0001$). A maior expressão do gene foi observada no ramo 1. No entanto, não houve diferença nos níveis de expressão de *PR4* entre os ramos deste tratamento ($F = 2,94$; $p = 0,0995$) (Figura 9).

Comparando entre os tratamentos, os níveis de *PR1* do ramo 1 na segunda coleta apresentaram diferença ($F = 82,83$; $p < 0,0001$), com destaque ao tratamento virulíferos. Não foi observada diferença nos níveis de *PR4* do ramo 1 entre os tratamentos ($F = 2,79$; $p = 0,0814$) (Figura 9). No ramo 2 da segunda coleta, não foi constatada diferença tanto nos níveis de *PR1* ($F = 0,53$; $p = 0,5932$), quanto nos níveis de *PR4* ($F = 0,09$; $p = 0,9122$) entre os tratamentos (Figura 9).



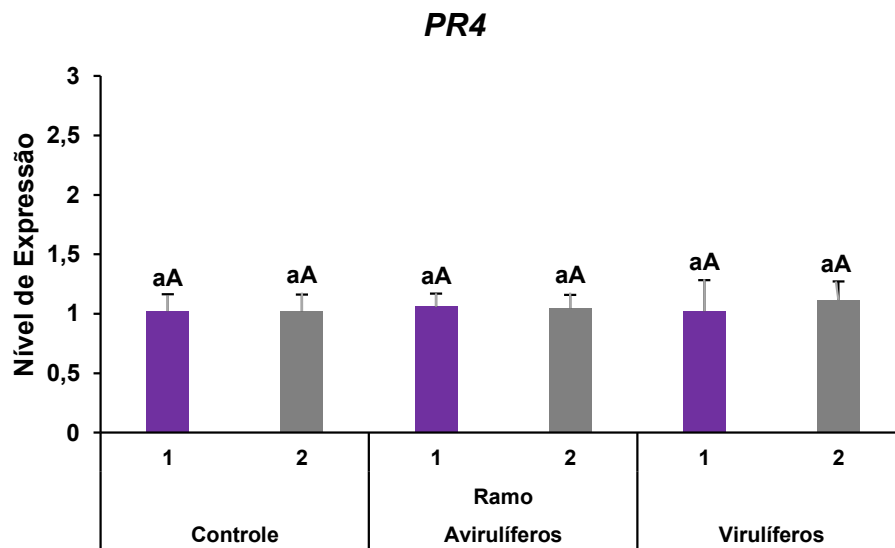


Figura 9. Comparação dos níveis de expressão dos genes *PR1* e *PR4* entre os ramos 1 e 2 da segunda coleta (35 dias após a segunda infestação), e entre os tratamentos. *Letras minúsculas comparam ramo 1 e 2 dentro de cada tratamento e gene, e maiúsculas comparam o gene em cada ramo entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

As interações existentes entre planta, artrópode-vetor e fitopatógeno são complexas e exigem a realização de estudos aprofundados a fim de entender os processos de transmissão e das respostas defensivas das plantas (Walling, 2000; Howe e Schaller, 2008). Na presente pesquisa, buscou-se compreender as respostas defensivas de plantas cítricas infestadas com o ácaro-vetor na presença ou ausência de CiLV-C, assim como estudou-se o desenvolvimento populacional do vetor na presença de lesões de leprose, ou de abrigos que mimetizam essas lesões. Além disso, também obtivemos respostas em relação ao desenvolvimento e colonização de *B. yothersi* mediante uma infestação prévia das plantas com ácaros da mesma espécie.

A realização do experimento preliminar foi essencial para o esclarecimento de questões em relação à colonização dos ácaros em plântulas e em relação à inoculação do CiLV-C. As plântulas de laranja-doce (*C. sinensis*) utilizadas no

experimento preliminar, por serem muito jovens, provavelmente não propiciaram as condições adequadas para o desenvolvimento dos ácaros uma vez que a população contabilizada ao final do experimento foi muito baixa em todos os tratamentos, inviabilizando a comparação dos resultados.

Durante o período do experimento preliminar, demonstrou-se também que a inoculação do CiLV-C nas plantas foi consideravelmente bem-sucedida devido à expressão dos sintomas (Figura 10). Todavia, assim como relatado por Rodrigues et al. (2007), as lesões em sua maioria permaneceram concentradas no pecíolo das folhas e nos ramos, o que dificultou a sua aplicação em experimentos biológicos e moleculares.

Baseando-se nestes resultados, pode-se afirmar que o uso de plântulas não é recomendável sob condições semelhantes às propostas neste ensaio, e que envolvam, por exemplo, o comportamento de *B. yothersi* e a resposta de defesa vegetal. Como solução do problema, indica-se a realização destes experimentos em mudas de citros com mais de um ano de idade, preferencialmente formadas por porta-enxerto e copa, e que permaneçam todo o período experimental em casa de vegetação. Com isso, será proporcionado um ambiente mais adequado ao desenvolvimento dos ácaros.

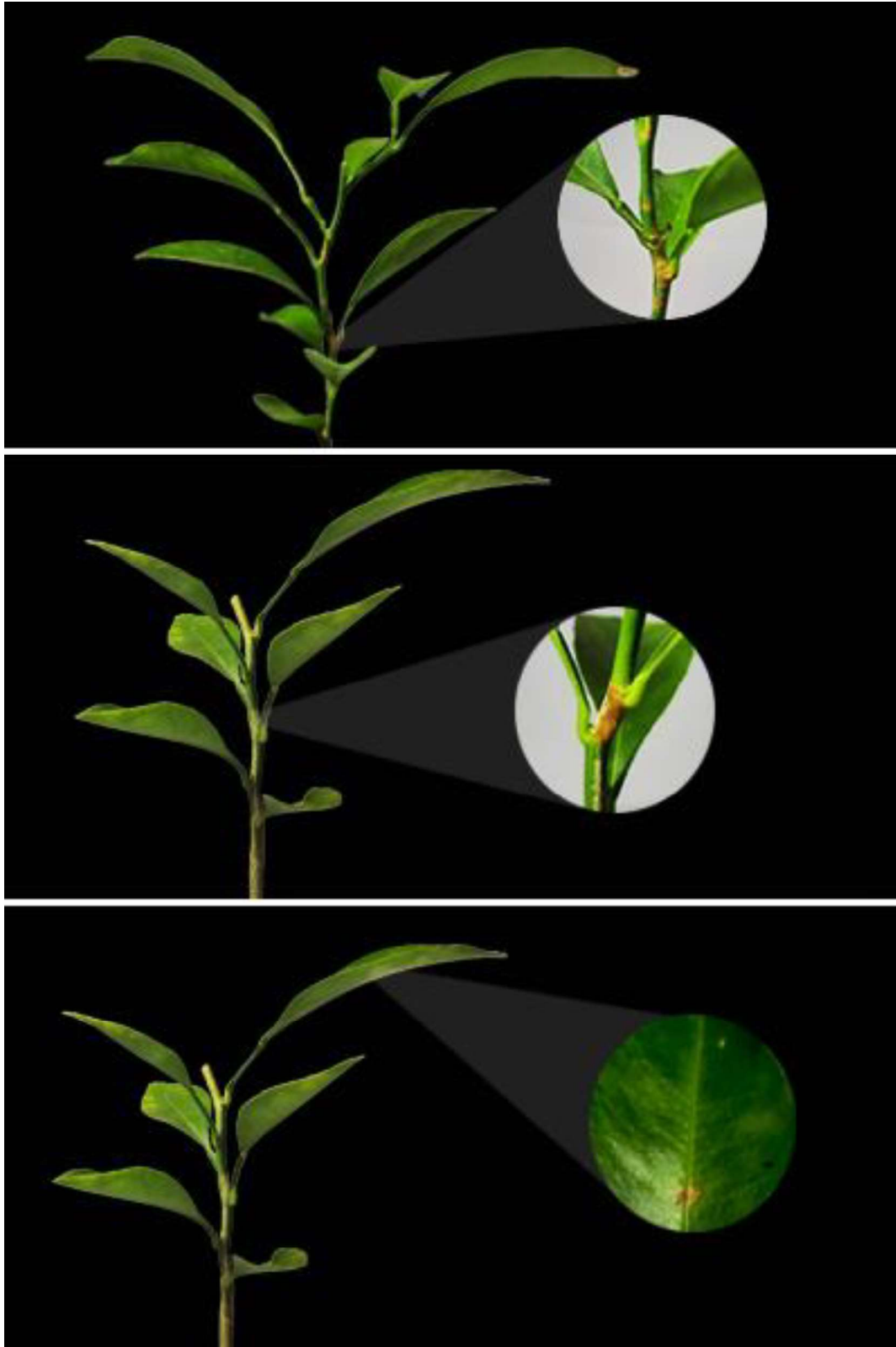


Figura 10. Plântulas de laranja doce 45 dias após a transferência de ácaros virulíferos para o experimento preliminar, com destaque para os sintomas de leprose.

Os resultados do experimento principal indicaram que a primeira infestação com ácaros avirulíferos e virulíferos influenciou positivamente na oviposição e na quantidade de indivíduos adultos nas plantas. Além disso, a adição de mistura de gesso, areia e farinha de trigo para promover saliências e reentrâncias (lesões artificiais), assim como os próprios sintomas de leprose (lesões naturais) possivelmente foram fatores favoráveis para o aumento da população de ácaros em todos os seus estágios.

Houve aumento significativo em todas as fases ativas dos ácaros quando estabelecidos em plantas com lesões artificiais e naturais, tanto avirulíferos quanto virulíferos. O uso de lesões artificiais, obtidas com a aplicação de uma mistura contendo gesso, areia, farinha de trigo e água, objetiva mimetizar os sintomas da verrugose dos citros, doença ocasionada pelos fungos *E. fawceti* e *E. australis*, que conferem abrigo para populações do ácaro (Bitancourt e Jenkins, 1936). Rotineiramente utilizada na manutenção de criações de *B. yothersi* em laboratório, o emprego dessa mistura foi relatado aumentando a eficiência da transmissão do CiLV-C em plantas cítricas (Rodrigues et al., 2007).

Diversos autores relataram que o ácaro da leprose é frequentemente encontrado em frutos com lesões de verrugose (Nakano et al., 1987, Chiaradia e Souza, 2001), e que estes são mais adequados para seu desenvolvimento (Chiavegato e Kharfan, 1993). Seguidos dos frutos, os ramos das plantas também proporcionaram melhores condições de colonização aos ácaros, devido a presença de abrigos, como rachaduras, fendas e outros tipos de superfícies irregulares, onde as fêmeas ovipositam e garantem um ambiente protegido à sua futura prole (Jeppson et al., 1975; Childers et al., 2003b).

A presença de lesões de leprose no tratamento com ácaros virulíferos também influenciou positivamente no número de ovos e fases móveis de *B. yothersi*, de maneira semelhante ao tratamento com ácaros avirulíferos que receberam a mistura a base de gesso (Figura 11). No entanto, não foi possível confirmar se apenas a presença do tecido irregular das lesões influenciou no estabelecimento dos ácaros nestas plantas, ou seja, se o efeito foi estritamente comportamental (uma vez que a oviposição é favorecida pela presença de esconderijos para as fêmeas), ou se houve alguma resposta hormonal ao vírus, que favorece o desenvolvimento do ácaro.

Estudos sobre a atuação do porta-enxerto de plantas de laranja, disponibilidade hídrica e nutrição das plantas na relação entre ácaros *Brevipalpus* sp. e o CiLV-C, verificaram que a população de ácaros virulíferos em plantas contendo leprose foi maior que a população de ácaros avirulíferos, indicando um possível favorecimento dos ácaros pela infecção do vírus (Andrade et al., 2013). Porém, pode-se supor que tanto o ácaro quanto o vírus tenham utilizado da vulnerabilidade da planta quando em estresse, garantindo uma maior colonização do ácaro, e conseqüente aumento das lesões de leprose.

Por outro lado, Arena et al. (2016) constataram que após 13 dias da infestação de *A. thaliana* com *B. yothersi* avirulíferos e virulíferos, o número de ácaros foi superior nas plantas que receberam indivíduos virulíferos, e que apresentavam sintomas de CiLV-C. Neste caso, foi proposto que a infecção pelo vírus da leprose tenha tornado as plantas mais atrativas ao desenvolvimento dos ácaros, através da indução de genes da via de SA. Os mesmos autores, trabalhando com mutantes de *A. thaliana*, demonstraram que ácaros *B. yothersi* são favorecidos pela indução de SA, resultando no seu crescimento populacional (Arena et al., 2018).



Figura 11. Folha com lesões de leprose 40 dias após a primeira infestação com ácaros virulíferos, e folha com mistura de gesso para mimetização de lesões.

No presente experimento, ramos que receberam a primeira infestação de ácaros, tanto avirulíferos quanto virulíferos, apresentaram maior número de ácaros, principalmente das fases de ovo e adulto, comparados aos ramos que receberam

apenas a segunda infestação. Este primeiro contato dos ácaros com as plantas provavelmente resultou na manipulação de seus mecanismos de defesa que, ao invés de favorecer a própria planta, favoreceram os ácaros. Estudos realizados por Sarmiento et al. (2011) também apontaram que populações de *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard (Acari: Tetranychidae) se desenvolveram melhor em plantas que foram previamente infestadas por outros ácaros. Glas et al. (2014) observaram maior infestação de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) em plantas de tomate, quando as mesmas já estavam infestadas com *Aculops lycopersici* (Tryon) (Acari: Eriophyidae), devido à grande atividade de manipulação de hormônios pelos ácaros, o que beneficiou *T. urticae*. Arena et al. (2018), ao avaliarem os mecanismos de defesa envolvidos na interação entre *A. thaliana* e *B. yothersi*, descobriram que ocorre uma reprogramação transcricional das plantas quando estas estão colonizadas com os ácaros, sugerindo que estes artrópodes possuem a capacidade de manipular as defesas da planta ao seu favor.

Os hormônios SA e JA apresentam grande influência na coordenação da sinalização necessária para a ativação dos mecanismos de defesa das plantas (Mysore e Ryu, 2004). Dessa forma, as vias do SA e JA interagem e podem controlar uma à outra, fazendo com que muitas vezes, suas respostas sejam antagônicas (Kunkel e Brooks, 2002). O JA é essencial no controle da defesa das plantas contra herbívoros, mediando grande parte das respostas induzidas por ferimentos e herbivoria (Wu e Baldwin 2010). A via do JA é dividida em duas linhas antagônicas e interconectadas: uma que atua na resposta à patógenos necrotróficos, e outra que ativa a defesa contra herbívoros (Pieterse et al., 2012; Schmiesing et al., 2016).

O SA atua na defesa central contra fitopatógenos, aumentando seus níveis nas células vegetais a fim de alcançar uma ampla gama de possíveis invasores (Ryals et al., 1996). Apesar de atuar contra fitopatógenos, a via do SA também trabalha na resposta à estímulos de herbívoros que causam injúrias mínimas (como perfuração do tecido vegetal) (Walling, 2000), que é o observado no caso dos ácaros. Ao se alimentar, *B. yothersi* tende a perfurar o parênquima das folhas e injetar saliva nas células do mesófilo usando seus estiletes, absorvendo esse conteúdo em seguida por meio da cavidade pré-oral (Alberti e Kitajima, 2014). No presente experimento, constatou-se que houve aumento dos níveis de JA no tratamento com ácaros

avirulíferos, indicando a resposta da planta à sua alimentação, e aumento dos níveis de SA principalmente no tratamento com ácaros virulíferos, o que sugere a ativação da resposta vegetal contra o patógeno.

A análise molecular das folhas da primeira coleta (apenas ramo 1, 30 dias após a primeira infestação) indicou que os níveis de expressão do gene *PR1* (marcador da via de SA) não diferiram entre os tratamentos. Em contrapartida, os níveis de expressão gene *PR4* (marcador da via de JA) diferiram entre o tratamento com ácaros avirulíferos e o controle. Neste caso, a maior concentração de *PR4* no tratamento com ácaros avirulíferos pode justificar o mecanismo de resposta da planta à herbivoria.

Arena et al. (2016) também verificaram que resposta hormonal das plantas de *A. thaliana* quando infestadas por ácaros avirulíferos e virulíferos (CiLV-C) foi superior aos 25 dias após infestação, período similar ao avaliado no presente trabalho. Complementarmente, os níveis dos hormônios referentes ao SA foram também maiores em plantas virulíferas, e de JA superiores em plantas avirulíferas, corroborando os resultados encontrados para plantas de laranja doce.

Na segunda coleta (ramo 1, 35 dias após a segunda infestação), os níveis de expressão de *PR1* e *PR4* foram superiores nas folhas das plantas do tratamento com primeira infestação de ácaros virulíferos, embora tenham recebido apenas ácaros avirulíferos na segunda infestação. Tendo em vista que o CiLV-C tem maior capacidade de manipulação das respostas vegetais quando comparado à herbivoria dos ácaros, tal fato pode ter ocorrido devido ao período necessário para ativação da resposta defensiva da planta, que se sucedeu à primeira instância apenas para JA, contra a herbivoria dos ácaros aos 30 dias após a primeira infestação, e evoluiu para a ativação de JA e SA simultaneamente, em decorrência também da infecção viral aos 35 dias após a segunda infestação. Arena et al. (2018) apontaram que os níveis de JA e SA de plantas infestadas com *B. yothersi* aumentaram simultaneamente em seus experimentos, além da constatação da presença de explosão de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos locais de alimentação dos ácaros.

As respostas de plantas de tomate à alimentação de *T. urticae* também indicaram elevada indução de JA e SA pelos ácaros (Kant et al., 2004), assim como observado para *B. yothersi* em plantas de laranja-doce. Em muitos casos, também deve-se levar em consideração a alta capacidade de artrópodes e fitopatógenos em

manipular os recursos defensivos vegetais a favor de cada um deles, ou de ambos (Glas et al., 2014). Estudos afirmaram que a capacidade de manipulação cruzada de SA e JA é uma característica de artrópodes herbívoros. Por exemplo, Zhang et al. (2013) demonstraram que ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) inibem a ação de JA e induzem de SA como forma de aumentar seu desempenho biológico.

Os ramos que não receberam a primeira infestação (ramo 2) apresentaram níveis de expressão de *PR1* e *PR4* estáveis, independentemente do tratamento, indicando uma resposta defensiva local. É importante ressaltar que no ramo 2, a população de ácaros não diferiu entre os tratamentos. Embora os ramos 1 e 2 são partes constituintes da mesma planta, as respostas observadas nos ramos 1 foram diferentes das observadas nos ramos 2. Não houve favorecimento do aumento populacional dos ácaros nos ramos 2 com a primeira infestação dos ramos 1, bem como os níveis de expressão de genes marcadores de vias de JA e SA não foram superiores nestes ramos quando comparados aos ramos 1 dos tratamentos virulíferos e avirulíferos. A resposta defensiva das plantas, de maneira geral, é ativada de forma sistêmica (Green e Ryan, 1972; Howe e Schaller, 2008); no entanto, o efeito local é sabidamente mais intenso e, portanto, esse resultado já era esperado, principalmente considerando-se o pequeno número de lesões de leprose obtidas nos ramos 1, e a natureza não sistêmica da doença.

Levando em consideração a interação entre vírus e ácaro, estudos afirmam que para uma maior disseminação, é vantajoso para o fitopatógeno que o desempenho e o comportamento de seu vetor também sejam beneficiados (Eigenbrode et al., 2018). Foi constatado por Arena et al. (2018) que o SA favorece *B. yothersi*, já que seu desenvolvimento foi menor quando utilizadas *A. thaliana* mutantes com deficiência deste hormônio. Também foi demonstrado em pesquisas acerca do patossistema leprose que o CiLV-C tem a capacidade de induzir a via do SA e reprimir de JA em plantas de *A. thaliana*, favorecendo o ácaro e conseqüentemente a disseminação do vírus (Arena et al., 2016), assim como comprovamos no presente estudo que o CiLV-C tem a capacidade de induzir a via do SA e reprimir de JA em plantas de laranja-doce.

Neste trabalho, foram apresentadas importantes informações sobre o desenvolvimento de *B. yothersi* em citros, considerando a presença ou ausência de CiLV-C nas plantas. No entanto, mais estudos serão necessários para esclarecer o papel do vírus da leprose na manipulação comportamental de seu ácaro vetor, e dos mecanismos de defesa em plantas de citros.

6. CONCLUSÕES

A primeira infestação de plantas de laranja-doce com ácaros *B. yothersi* favoreceu o aumento da população dos ácaros independentemente da presença ou não de CiLV-C.

A presença das lesões de leprose e da mistura de gesso contribuiu para o aumento populacional de *B. yothersi* em todas as suas fases.

Ácaros *B. yothersi* induzem a via de ácido jasmônico nas plantas, que ocorre devido sua herbivoria.

O CiLV-C reprime a via de ácido jasmônico, e induz a via de ácido salicílico nas plantas como forma de beneficiar seu vetor *B. yothersi*, aumentando conseqüentemente suas chances de disseminação.

7. REFERÊNCIAS

Alberti G, Kitajima EW (2014) Anatomy and Fine Structure of *Brevipalpus* Mites (Tenuipalpidae)-Economically Important Plant-Virus Vectors. **Zoologica** 160:1-92.

Andrade DJ, Falconi RS, Siqueira DS, Barbosa CL, Ferraudo AS, Oliveira CA (2013) The influence of citrus rootstocks on the relationship between the mite *Brevipalpus phoenicis* and citrus leprosis disease. **Pest Management Science** 69:81-87.

Araya-González J (2000) Informe sobre la prospección de la "leprosis de los cítricos" en la zona fronteriza sur (Costa Rica – Panamá). **Ministerio de Agricultura y Ganadería** 2000, 5.

Arena GD, Bergamini MP, Tassi AD, Kitajima EW, Kubo KS, Freitas-Astúa J (2013) Citrus Leprosis Virus C Infects *Arabidopsis thaliana*, the Model for Plant-Pathogen Interactions. **Journal of Plant Pathology** 95:448.

Arena GD, Ramos-González PL, Nunes MA, Ribeiro-Alves M, Camargo LE, Kitajima EW, Machado MA, Freitas-Astúa J (2016) Citrus leprosis virus C infection results in

hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. **Frontiers in Plant Science** 7:1–17.

Arena GD, Ramos-González PL, Rogerio LA, Ribeiro-Alves M, Casteel CL, Freitas-Astúa J, Machado MA (2018) Making a better home: modulation of plant defensive response by *Brevipalpus* mites. **Frontiers in Plant Science** 9:1147.

Bassanezi RB, Czermainski ABC., Laranjeira FF, Moreira AS, Ribeiro PJ, Krainski ET, Amorim L (2019) Spatial patterns of the Citrus leprosis virus and its associated mite vector in systems without intervention. **Plant Pathology** 68:85-93.

Bastianel M, Novelli VM, Kitajima EW, Kubo KS, Bassanezi RB, Machado MA, Freitas-Astúa J (2010) Citrus leprosis: Centennial of an unusual mite–virus pathosystem. **Plant Disease** 94:284–292.

Beard JJ, Ochoa R, Braswell WE, Bauchan G (2015) *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae) - a closer look. **Zootaxa** 3944:1-67.

Bitancourt AA (1934) Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. **Arquivos do Instituto Biológico** (São Paulo) 5:185-196.

Bitancourt AA (1955) Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico** 22:161-231.

Bitancourt AA, Jenkins AE (1936) Perfect stage of the sweet orange fruit scab fungus. **Mycologia** 28:489–492.

Chabi-Jesus C, Ramos-González PL, Tassi AD, Guerra-Peraza O, Kitajima EW, Harakava R, Beserra JEA, Salaroli Jr RB, Freitas-Astúa J (2018) Identification and characterization of Citrus chlorotic pot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease** 102:1588-1598.

Chabi-Jesus C, Ramos-González PL, Barro MP, Fontelle RS, Harakava H, Bassanezi RB, Moreira AS, Kitajima EW, Varsani A, Freitas-Astúa J (2021) Molecular epidemiology of citrus leprosis virus C: a new viral lineage and phylodynamic of the main viral subpopulations in the Americas. **Frontiers in Microbiology** 12: 641252.

Chiaradia LA, Souza LC (2001) Flutuação populacional do "ácaro da leprose" *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari, Tenuipalpidae) em pomares de citros do Oeste Catarinense. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** 7:201-209.

Chiavegato LG (1986) Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 21:813-816.

Chiavegato LG, Kharfan PR (1993) Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 22:355–359.

Childers CC, Rodrigues JCV, Derrick KS, Achor DS, French JV, Welbourn WC, Ochoa R, Kitajima EW (2003a) Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental and Applied Acarology** 30:181-202.

Childers CC, Rodrigues JCV, Welbourn WC (2003b) 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** 30:29-105.

Colariccio A, Lovisolo O, Chagas CM, Galetti SR, Rossetti V, Kitajima EW (1995) Transmissão mecânica e aspectos ultraestruturais do vírus da leprose dos citros. **Fitopatologia Brasileira** 20:208-213.

Cook G, Kirkman W, Clase R, Steyn C, Basson E, Fourie PH, Moore SD, Grout TG, Carstens E, Hattingh V (2019) Orchid fleck virus associated with the first case of citrus leprosis-N in South Africa. **European Journal of Plant Pathology** 155:1.373-1.379.

Cranham JE, Helle W, Sabelis MW (1985) Spider mites: their biology, natural enemies and control. **Pesticide Resistance Tetranychids** 1:405-421.

Cruz-Jaramillo JL, Ruiz-Medrano R, Rojas Morales L, López-Buenfil JA, Morales-Galván O, Chavarín-Palacio C, Ramírez-Pool JA, Xoconostle-Cázares B (2014) Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. **Viruses** 6:2602-22.

Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411:826-833.

Della Vechia JF, Bassanezi RB, Andrade DJ (2019) Physicochemical and biological compatibility of insecticide mixtures with acaricide in the management of *Brevipalpus yothersi*. **Systematic and Applied Acarology** 24:1455-1464.

Dominguez FS, Bernal A, Childers CC, Kitajima EW (2001) First report of citrus leprosis on Panama. **Plant Disease** 85:228-228.

Demole E, Lederer E, Mercier D (1962) Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta** 45:675-685.

Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, Davis TS (2018) Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. **Annual Review of Entomology** 63:169-191.

Freitas-Astúa J, Ramos-González PL, Arena GD, Tassi AD, Kitajima EW (2018) *Brevipalpus*-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion in Virology** 33:66-73.

Frezzi MS (1940) La lepra explosiva del naranjo. **Boletín Frutas y Hortalizas** 5:16.

Fundecitrus (2019) Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2020_06_25_Inventário_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2020-20211.pdf. Acesso em: 3 mar. 2021.

Fundecitrus (2021a) Citricultura é uma das cadeias do agronegócio que mais emprega, com 1 posto de trabalho a cada 9 hectares. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/citricultura-e-uma-das-cadeias-do-agronegocio-que-mais-emprega-com-1-posto-de-trabalho-a-cada-9-hectares/1008>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

Fundecitrus (2021b) Estimativa da safra de laranja Parque Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

Fundecitrus (2021c) Produtividade e sustentabilidade: cinturão de SP e MG é a principal região produtora de laranja e suco de laranja do mundo. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/produtividade-e-sustentabilidade-cinturao-de-sp-e-mg-e-a-principal-regiao-produtora-de-laranja-e-suco-de-laranja-do-mundo/1009>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

Fundecitrus (2021d) Taxa de queda de frutos bate recorde na safra 2020/2021; seca severa e aumento de pragas e doenças são os principais motivos. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/taxa-de-queda-de-frutos-bate-recorde-na-safra-20202021-seca-severa-e-aumento-de-pragas-e-doencas-sao-os-principais-motivos/1051>>. Acesso em: 12 jul. 2021.

Garita LC, Tassi AD, Calegario RF, Freitas-Astúa J, Salaroli RB, Romão GO, Kitajima EW (2014) Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology** 39:43-55.

Glas JJ, Alba JM, Simoni S, Villarroel CA, Stoops M, Schimmel BC, Schuurink RC, Sabelis MW, Kant MR (2014). Defense suppression benefits herbivores that have a monopoly on their feeding site but can backfire within natural communities. **BMC biology** 12:1-14.

Gómez EC, Vargas MR, Rivadameira C, Locali EC, Freitas-Astúa J, Astúa-Monge G, Rodrigues JCV, Mesa-Cobo NC, Kitajima EW (2005) First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. **Plant Disease** 89:686-686.

Green TR, Ryan CA (1972) Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science** 175:776–777

Groot TVM, Breeuwer JAJ (2006) Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. **Experimental and Applied Acarology** 39:257–271.

Haramoto FH (1966) Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae). 105 f. Tese - University of Hawaii, Honolulu.

Helle W, Bolland HR, Heitmans WRB (1980) Chromosomes and types of parthenogenesis in false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica** 54:45–50.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesomepele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology** 8:R19.

Hogenhout SA, Bos JI (2011) Effector proteins that modulate plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology** 14:422-428.

Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review Phytopathology** 46:327-359.

Howe GA, Schaller A (2008) Direct defenses in plants and their induction by wounding and insect herbivores. In: **Induced Plant Resistance to Herbivory**. Dordrecht: Springer p 7–29.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021a) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/188>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021b) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

Izquierdo-Castillo I, Zermeño-Díaz LF, Méndez W, Otero-Colina G, Freitas-Astúa J, Locali-Fabris EC, de Moraes GJ, Faier-Calegario R, Tassi AD, Kitajima EW (2011) Confirmation of the presence of the Citrus leprosis virus C (CiLV-C) in Southern Mexico. **Tropical Plant Pathology** 36:400-403.

Jeppson LR, Keifer HH, Baker EW (1975) **Mites injurious to economic plants**. Berkeley: University of California Press. 614 p.

Kant MR., Ament K, Sabelis MW, Haring MA, Schuurink RC (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. **Plant Physiology** 135:483-495.

Kant MR, Jonckheere W, Knecht B, Lemos F, Liu J, Schimmel BCJ, Villarroel CA, Ataíde LMS, Dermauw W, Glas JJ, Egas M, Janssen A, Van Leeuwen T, Schuurink RC, Sabelis MW, Alba JM (2015) Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in herbivore communities. **Annals of Botany** 115:1015–1051.

Karban R, Myers JH (1989) Induced plant responses to herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics** 20:331-348.

Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology** 53:299-328.

Kitajima EW, Müller GW, Costa AS, Yuki W (1972) Short, rod-like particles associated with Citrus leprosis. **Virology** 50:254-258.

Kitajima EW, Rodrigues JCV, Freitas-Astua J (2010) An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Scientia Agricola** 67:348-371.

Knorr LC (1950) Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. **Phytopathology** 40:15.

Knorr LC (1968) Studies on the etiology of leprosis in citrus. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings** 4:332–340.

Knorr LC, DuCharme EP (1951) The relationship between Argentina's lepra explosiva and Florida's scaly bark, with implications for the Florida citrus grower. **Plant Disease Reporter** 35:70–75.

Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology** 5:325-331.

Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature** 411:848-853.

Laranjeira FF, Silva SXB, Andrade EC, Almeida DO, Silva TSM, Soares ACF, Freitas-Astúa J (2015) Infestation dynamics of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) in citrus orchards as affected by edaphic and climatic variables. **Experimental and Applied Acarology** 66:491-508.

León MG, Realpe CE, Garzon PA, Rodriguez JA, Moreno PMG, Childers CC, Achor D, Freitas-Astua J, Antonioli-Luizon R, Salaroli RB, Mesa CNC, Kitajima EW (2006) Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease** 90:682-682.

León MG, Becerra CH, Freitas-Astúa J, Salaroli RB, Kitajima EW (2008) Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease** 92:1364.

Lewinsohn TM, Jorge LR, Prado PI (2012) Biodiversidade e interações entre insetos herbívoros e plantas. In: **Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva** p275–289.

Locali EC, Freitas-Astúa J, Souza AA, Takita MA, Astúa-Monge G, Antonioli R, Kitajima EW, Machado MA (2003) Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease** 87:1317–1321.

Mafrá V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM, Machado MA (2012) Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **PLoS ONE** 7:e31263.

Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J, Machado MA (2013) *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. **BMC Genomics** 14:247.

Mejia L, Paniagua A, Cruz N, Porras M, Palmieri M (2002) Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. In.: **Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the American Phytopathological Society** Caribbean Division, Antigua, Guatemala, p.17-19.

Mineiro JLC, Sato ME, Ochoa R, Beard J, Bauchan G (2018) Revisão taxonômica do ácaro da leprose dos citros e sua distribuição no Brasil. **Citrus Research and Technology** 39:1–11.

Musumeci MR, Rossetti V (1963) Transmissão dos sintomas da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura** 15:228.

Mysore KS, Ryu CM (2004) Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science** 9:97-104.

Nachappa P, Challacombe J, Margolies DC, Nechols JR, Whitfield AE, Rotenberg D (2020) Tomato spotted wilt virus benefits its thrips vector by modulating metabolic and plant defense pathways in tomato. **Frontiers in Plant Science** 11: 575564.

Nakano O, Sanches GA, Ishida AK (1987). Redução da infestação do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros através do controle da verrugose. **Laranja** 8:19-34.

Navia D, Mendonça RS, Ferragut F, Miranda LC, Trincado RC, Michaux J, Navajas M (2013) Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologica Scripta** 42:406–426.

Ng JC, Falk BW (2006) Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology** 44:183-212.

Novelli VM, Freitas-Astúa J, Locali-Fabris EC, Bastianel M, Antonioli-Luizon R, Ribeiro BM, Machado MA (2007) Detecção do vírus da leprose dos citros no ácaro vetor. **Citrus Research and Technology** 28:1-2.

Nunes MA; Bergamini MP, Coerini LF, Bastianel M, Novelli VM, Kitajima EW, Freitas-Astúa J (2012) Citrus leprosis virus C (CiLV-C) naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of citrus orchards in Brazil. **Plant Disease** 96:770.

Nunes MA; Mineiro JLC; Rogerio L, Ferreira LM, Tassi AD, Novelli VM; Kitajima EW, Freitas-Astúa J (2018) First report of *Brevipalpus papayensis* Baker (Acari: Tenuipalpidae) as vector of Coffee ringspot virus and Citrus leprosis virus C. **Plant Disease** 102:1046.

- Pascon RC, Kitajima JP, Breton MC, Assumpção L, Greggio C, Zanca AS, Okura VK, Alegria MC, Camargo ME, Silva GGC, Cardozo JC, Vallim MA, Franco SF, Silva VH, Junior HJ, Oliveira F, Giachetto PF, Ferrari F, Aguilar-Vildoso CI, Franchiscini FJB, Silva JMF, Arruda P, Ferro JA, Reinach F, Silva ACR (2006) The complete nucleotide sequence and genomic organization of citrus leprosis associated virus, cytoplasmatic type (CiLV-C). **Virus Genes** 32:289–298.
- Perilla-Henao LM, Casteel CL (2016) Vector-borne bacterial plant pathogens: interactions with hemipteran insects and plants. **Frontiers in Plant Science** 7:1163.
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 28:489–521.
- Ramos-González PL, Chabi-Jesus C, Arena GD, Tassi AD, Kitajima EW, Freitas-Astúa J (2018) Citrus leprosis: a unique multietiological disease. **Citrus in the Americas** 1:4-19.
- Ramos-González PL, Chabi-Jesus C, Guerra-Peraza O, Tassi AD, Kitajima EW, Harakava R, Salaroli RB, Freitas-Astúa J (2017) Citrus leprosis virus N: a new dichorhavirus causing Citrus Leprosis disease. **Phytopathology** 107:963-976.
- Ramos-González PL, dos Santos GF, Chabi-Jesus C, Harakava R, Kitajima EW, Freitas-Astúa J (2020) Passion fruit green spot virus genome harbors a new orphan ORF and highlights the flexibility of the 5'-end of the RNA2 segment across Cileviruses. **Frontiers in Microbiology** 11:206.
- Rodrigues JCV, Childers CC, Kitajima EW, Machado MA, Nogueira NL (2001) Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. **Laranja** 22:412-423.
- Rodrigues JCV, Kitajima EW, Childers CC, Chagas CM (2003) Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology** 30:161-179.
- Rodrigues VA, Bastianel MA, Kubo KA, Fadel AL, Nicolini F, Novelli VM, Freitas-Astúa J (2007) Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja** 28:29–38.
- Roy A, Choudhary N, Guillermo LM, Shao J, Govindarajulu A, Achor D, Wei G, Picton DD, Levy L, Nakhla MK, Hartung JS, Brlansky RH (2013) A novel virus of the genus Cilevirus causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology** 103:488-500.
- Roy A, Hartung JS, Schneider WL, Shao J, Leon G, Melzer MJ, Beard JJ, Otero-Colina G, Bauchan GR, Ochoa R, Brlansky RH (2015) Role bending: Complex relationships between viruses, hosts, and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. **Phytopathology** 105:1013-1025.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. **The plant cell** 8:1809.

- Sánchez-Velázquez EJ, Santillán-Galicia MT, Novelli VM, Nunes MA, Mora-Aguilera G, Valdez-Carrasco JM, Otero-Colina G, Freitas-Astúa J (2015) Diversity and genetic variation amongst *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. **PLoS One** 10:1-16.
- Sarmiento RA, Lemos F, Bleeker PM, Schuurink RC, Pallini A, Oliveira MGA, Lima ER, Kant M, Sabelis MW, Janssen A (2011) A herbivore that manipulates plant defence. **Ecology letters** 14:229-236.
- SAS Institute (2015) SAS/IML® 14.1 User`s Guide. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- Schaller A, Stintzi A (2008) Jasmonate biosynthesis and signaling for induced plant defense against herbivory. In **Induced plant resistance to herbivory** Dordrecht: Springer p. 349-366.
- Schmiesing A, Emonet A, Gouhier-Darimont C, Reymond P (2016) Arabidopsis MYC transcription factors are the target of hormonal salicylic acid/jasmonic acid cross talk in response to *Pieris brassicae* egg extract. **Plant Physiology** 170:2432–2443.
- Spegazzini C (1920) Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de "agrios" en el Paraguay. **Annales de la Sociedad Científica Argentina** 90:155-188.
- Stark JD, Banks JE (2003) Population-Level Effects of Pesticides and Other Toxicants on Arthropods. **Annual Review of Entomology** 48:505–519.
- Szczepaniec A, Finke D (2019) Plant-vector-pathogen interactions in the context of drought stress. **Frontiers in Ecology and Evolution** 7:262.
- Tang X, Wang X, Huang Y, Ma L, Jiang X, Rao MJ, Xu Y, Yin P, Yuan M, Deng X, Xu Q (2021) Natural variations of TFIIA γ gene and LOB1 promoter contribute to citrus canker disease resistance in *Atalantia buxifolia*. **PLoS Genetics** 17:e1009316.
- Tassi AD, Garita-Salazar LC, Amorim L, Novelli VM, Freitas-Astúa J, Childers CC, Kitajima EW (2017) Virus–vector relationship in the citrus leprosis pathosystem. **Experimental and Applied Acarology** 71:227-241.
- Tennant PF, Robinson D, Fisher L, Bennett SM, Hutton D, Coates-Beckford P, Mc Laughlin W (2009) Diseases and pests of Citrus (*Citrus* spp.). **Tree and Forestry Science and Biotechnology** 3:81-107.
- USDA – United States Department of Agriculture (2021) Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- Velarde AO, Roy A, Padmanabhan C, Nunziata S, Nakhla MK, Melzer M (2021) First report of orchid fleck virus associated with citrus leprosis symptoms in rough lemon (*Citrus jambhiri*) and mandarin (*C. reticulata*) the United States. **Plant disease** 00:ja.

- Walling LL (2000) The myriad plant responses to herbivores. **Journal of Plant Growth Regulation** 19:195–216.
- Weeks AR, Marec F, Breeuwer JA (2001) A mite species that consists entirely of haploid females. **Science** 292:2479-2482.
- Welbourn WC, Ochoa R, Kane EC, Erbe EF (2003) Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology** 30:107-133.
- Wu J, Baldwin IT (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. **Annual Review of Genetics** 44:1-24.
- Yan Y, Yuan Q, Tang J, Huang J, Hsiang T, Wei Y, Zheng L (2018). *Colletotrichum higginsianum* as a model for understanding host–pathogen interactions: a review. **International Journal of Molecular Sciences** 19:2142.
- Zhao S, Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology** 12:1047–1064.
- Zhang PJ, Li WD, Huang F, Zhang JM, Xu FC, Lu YB (2013). Feeding by whiteflies suppresses downstream jasmonic acid signaling by eliciting salicylic acid signaling. **Journal of Chemical Ecology** 39:612-619.
- Zhou C, da Graça JV, Freitas-Astúa J, Vidalakis G, Duran-Vila N, Lavagi I (2020) Citrus viruses and viroids. In **The Genus Citrus** Woodhead Publishing p. 391-410.