

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 12/06/2017.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE VÍRUS PRESENTES EM PLANTAS DE CITROS CULTIVADAS EM UMA REGIÃO AFETADA PELA MORTE SÚBITA DOS CITROS

EMILYN EMY MATSUMURA

BOTUCATU – SP
2016

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DAS POPULAÇÕES DE VÍRUS PRESENTES EM PLANTAS DE CITROS CULTIVADAS EM UMA REGIÃO AFETADA PELA MORTE SÚBITA DOS CITROS

NOME DA CANDIDATA: EMILYN EMY MATSUMURA
ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO MACHADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas
(Genética).

BOTUCATU – SP
2016

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Matsumura, Emilyn Emy.

Estudo das populações de vírus presentes em plantas de
citros cultivadas em uma região afetada pela morte súbita
dos citros / Emilyn Emy Matsumura. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências
de Botucatu

Orientador: Marcos Antonio Machado

Capes: 20202008

1. Cítricos. 2. Vírus. 3. Morte súbita dos citros.
4. Viroses das plantas. 5. Fitopatologia - Diagnóstico.

Palavras-chave: CSDaV; Morte súbita dos citros;

Sequenciamento de alta performance; Vírus de citros.

À minha mãe, Maria B. Dognani, que nunca mediu esforços para apoiar minha vida acadêmica, e por ser meu maior exemplo de dedicação e minha maior incentivadora.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado concedida, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro para realização do meu estágio no exterior através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE);

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da UNESP-Botucatu e a todos os funcionários, em especial ao coordenador Prof. Dr. Cláudio de Oliveira e Luciana por estarem sempre dispostos a me ajudar quando precisei; a todos os professores do Departamento de Genética por todos os ensinamentos;

Ao meu orientador, Dr. Marcos A. Machado, por ter confiado este trabalho a mim, por ter me dado total liberdade para desenvolvê-lo, e por todo o investimento, apoio e bons conselhos ao longo desses quatro anos;

Ao Dr. Helvécio D. Coletta Filho, por ter participado ativamente do planejamento, desenvolvimento e conclusão deste trabalho, e por toda a ajuda e incentivo no decorrer desses anos;

Ao Dr. Bryce W. Falk, meu supervisor durante meu estágio no exterior na Universidade da Califórnia (UC Davis, CA, EUA), por ter me recebido de forma atenciosa em seu laboratório, por todas as contribuições, paciência, ensinamentos, conselhos e bons momentos durante os 12 meses do meu doutorado sanduíche;

À Dra. Shahideh Nouri, com quem trabalhei efetivamente durante meu estágio no exterior, por todas as contribuições, por me incluir em outros projetos, por compartilhar os seus conhecimentos e pelo bom convívio e amizade ao longo desses 12 meses que estive na UC Davis;

Aos amigos Silvia de Oliveira Dorta e Tiago Silva Oliveira, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, e Luca Nerva, do Instituto para a Proteção Sustentável das Plantas (Itália), pela amizade e por terem me ajudado com determinados experimentos durante o desenvolvimento do projeto;

Aos membros da banca examinadora, Dr. Tatsuya Nagata (UnB – Brasília, DF), Dr. Ricardo Harakava (Instituto Biológico – São Paulo, SP) e Dr. Ivan de Godoy Maia (Unesp-IBB, SP) por todas as sugestões e pela valiosa discussão durante a arguição;

Aos colegas que convivi durante meu estágio no laboratório do Dr. Falk, Inma, Maria, AJ, Ola, Mark, Jared, Jeremy, Wenjie, Yen-Wen, Ana, Tera, Sandra, Eddie, Nida e Máximo, pela amizade, bom convívio e por todas as ajudas e sugestões; à minha querida amiga Cíntia, por toda a ajuda, amizade, carinho, e todos os momentos compartilhados tanto no Brasil quanto em Davis; e a todos os amigos que fiz durante meu estágio no exterior;

A todos os técnicos do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM), Rose, Anita, Kleber e Amélia, e todos os outros técnicos do CCSM, por toda a ajuda e paciência durante o tempo que estive no laboratório;

A todos os pesquisadores do CCSM, em especial ao Dr. Pedro L. R. Gonzalez (IB-SP), Dra. Alessandra A. de Souza e Dr. Marco Takita, pela ajuda, contribuições e incentivo sempre que precisei, e a todos os pós-docs, em especial a Dra. Michèle C. Breton e Dra. Carolina Munari por toda a ajuda no início do projeto;

A todos os alunos de pós-graduação e iniciação científica do CCSM, pela boa convivência e aos meus amigos Simone, Carol Sardinha, César, Gabi, Diogo, Bárbara, Willian e Camila, por todos os bons momentos compartilhados dentro e fora do laboratório;

Aos meus amigos mais que especiais, Inaiara, Francisco, Eduardo, Diogo, Tatiane, Laura, Tiago, Silvia, Paulo e Laís, por terem deixado essa vida de doutorando muito mais leve, por terem compartilhado comigo a rotina de laboratório, os cafés diários, os almoços, os jantares, os choros e as gargalhadas, e por terem sido minha família ao longo desses quatro anos, nossa família Estábulo;

Aos meus pais, Maria B. Dognani e Hiroaki Matsumura, pelo amor incondicional, por serem minha inspiração e por sempre estarem dispostos a me apoiarem em todas as minhas decisões; a todos os meus familiares e amigos de infância, que mesmo distantes estão sempre torcendo e me apoiando com muito amor; Ao Leonardo Jo, por todo apoio e todo amor nesses últimos meses de doutorado;

E por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e a todos os amigos que fiz durante essa caminhada. Muito obrigada!

Resumo

A morte súbita dos citros (MSC) causou a morte ou erradicação de aproximadamente quatro milhões de plantas de laranja doce na principal região citrícola do Brasil. Embora sua etiologia ainda não esteja completamente resolvida, seus sintomas e distribuição (especial e temporal) indicam uma provável doença viral. Trabalhos anteriores associaram a MSC ao vírus da tristeza dos citros (CTV) e ao CSDaV (*Citrus sudden death-associated virus*), no entanto, os resultados obtidos destes trabalhos não são conclusivos. Afim de estudar as populações de vírus presentes em plantas de citros afetadas pela MSC, este trabalho realizou uma análise comparativa, através do sequenciamento de alta performance do transcriptoma e dos pequenos RNAs de plantas sintomáticas e assintomáticas para MSC. Os dados revelaram uma infecção viral mista, incluindo o CTV como vírus mais predominante, seguido do CSDaV, um pararetrovírus endógeno de citros (CitPRV) e dois possíveis novos vírus, putativamente denominados de *Citrus jingmen-like virus* (CJLV) e *Citrus virga-like virus* (CVLV). As análises de correlação com a MSC indicaram uma provável associação de plantas sintomáticas com o CitPRV, enquanto que os dois novos vírus mostraram estar mais associados com plantas assintomáticas. A associação mais evidente foi observada entre plantas sintomáticas e um genótipo específico de CSDaV, o que nos conduziu a um estudo mais específico de variabilidade genética de 31 isolados de CSDaV, obtidos de plantas MSC-sintomáticas e assintomáticas. As análises de cinco regiões genômicas parciais do CSDaV, que correspondem aos domínios da metiltransferase, região de múltiplos domínios (MDR), helicase, RNA-dependente de RNA polimerase e capa proteica, mostraram que a região MDR apresentou maior diversidade genética. A diversidade nucleotídica (π) foi baixa para os isolados de CSDaV, e as análises filogenéticas revelaram a predominância de dois grupos principais, sendo que um deles se mostrou mais associado às plantas sintomáticas, o que foi coerente com os resultados relatados anteriormente. Além disso, os isolados de plantas sintomáticas mostraram maior diversidade nucleotídica, maiores taxas da relação dN/dS, e maior número de aminoácidos alterados, principalmente nas regiões mais próximas da região 5' terminal. Este trabalho gerou informações novas e importantes sobre o patossistema MSC. Tais informações foram consideradas para construção de um clone de cDNA do CSDaV, que poderá ser utilizado em outros estudos de etiologia, e também devem ser consideradas em futuros estudos epidemiológicos.

Palavras-Chave: Morte súbita dos citros, sequenciamento de alta performance, vírus de citros, CSDaV, CTV.

Abstract

Citrus sudden death (CSD) is a disease that caused death or eradication of approximately four million orange trees in a very important citrus region in Brazil. Although its etiology is still not completely clear, symptoms and distribution of affected plants indicate a viral disease. Previous works have associated *Citrus trsiteza virus* (CTV) and *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) with CSD, but all attempts to prove these association have failed so far. In attempting to study the virome of citrus plants affected by CSD, and compare the frequency and diversity of viruses between CSD-symptomatic and asymptomatic plants, we have done a comparative high-throughput sequencing analysis of the transcriptome and small RNAs from those plants by using Illumina platform. The data revealed a mixed infection that included CTV as the most predominant virus, followed by the CSDaV, *Citrus endogenous pararetrovirus* (CitPRV) and two putative novel virus tentatively named *Citrus jingmen-like virus* (CJLV) and *Citrus virga-like virus* (CVLV) in this study. We demonstrated a likely association of the CSD-symptomatic plants with CitPRV, whereas the two putative novel viruses showed to be more associated with CSD-asymptomatic plants. The strongest association was observed between CSD-symptomatic plants and a specific CSDaV genotype, which led us to study more specifically the genetic variability among 31 CSDaV isolates obtained from both CSD-symptomatic and asymptomatic plants. Analyses of partial nucleotide sequences of five domains of the CSDaV genomic RNA, including those encoding for the methyltransferase, the multi-domain region (MDR), the helicase, the RNA-dependent RNA polymerase and the coat protein, showed that the MDR coding region was the most diverse region assessed here. The nucleotide diversity (π) was low for CSDaV isolates, but the phylogenetic analyses revealed the predominance of two main groups, one of which showed a strong association with CSD-symptomatic plants, supporting the previous results obtained from the high-throughput analyses. Isolates obtained from CSD-symptomatic plants, compared to those obtained from asymptomatic plants, showed higher nucleotide diversity, nonsynonymous and synonymous substitution rates and number of amino acid changes on the coding regions located closer to the 5' end region of the genomic RNA. This work generated new and valuable information that were used to construct an infectious clone of the CSDaV, which will be used in further etiology studies, and that must be considered in further epidemiological studies.

Keywords: Citrus sudden death, high-throughput sequencing, citrus viruses, CSDaV, CTV

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 3.1. Profile distribution of reads from the RNA-seq and sRNA libraries along the three different <i>Citrus tristeza virus</i> isolates: A18, SG29 and TawainPum/SP/1.....	33
Figure 3.2. Profile distribution of reads from the RNA-seq and sRNA libraries along the two CSDaV isolates under accession numbers AY884005 and DQ185573.....	35
Figure 3.3. Profile distribution of total reads from the RNA-seq and sRNA libraries; and reads from combined asymptomatic and symptomatic libraries along the CitPRV genome...	38
Figure 3.4. Electrophoretic analysis of virus-specific PCR products amplified from total RNAs extracted from citrus collected in a CSD-affected region to validate the identified viral sequences.....	39
Figure 3.5. Phylogenetic relationships among RdRP and reverse transcriptase amino acid sequences from representative isolates of the CTV, CSDaV and CitPRV, including the respective viral sequences identified in this study.....	41
Figure 3.6. Schematic illustration of the predicted partial genome organization of the two putative novel viruses identified in this study: putative segment 1 of the CJLV genome and partial CVLV predicted genome.....	43
Figure 3.7. Phylogenetic relationships among helicase and RdRP amino acid sequences from representative isolates of the families <i>Flaviviridae</i> and <i>Virgaviridae</i> , including the respective viral sequences identified in this study.....	44
Figure 3.8. Profile distribution of reads from combined asymptomatic and symptomatic libraries along the two CTV consensus sequence obtained in this study: CTV_SPBR_01 and CTV_SPBR_02.....	46
Figure 3.9. Profile distribution of reads from combined asymptomatic and symptomatic libraries along the two CSDaV consensus sequence obtained in this study: CSDaV_SPBR_01 and CSDaV_SPBR_02.....	47
Figure 4.1. Genome organization of CSDaV indicating the two ORFs, the conserved domains and the genomic regions analyzed in this study.....	57
Figure 4.2. Bootstrap majority rule (70%) consensus trees reconstructed by the neighbor joining method for five genomic regions of CSDaV isolates including field collected and reference sequences. (a): MT segment; (b): MDR segment; (c): He segment; (d): RdRP segment; (e): CP segment.....	64
Figure 4.3. Phylogenetic relationship with potential recombinant CSDaV isolates as the query sequences based on concatenated nucleotide sequences of the MT, MDR, He, RdRP and CP genomic regions using Simplot. Three CSDaV isolates, VASW23S (a), CR8D (b) and CLBR43S (c), were used as query sequences and two CSDaV isolates were used as reference sequences.....	68

Figure 4.4. Bootscan analyses with potential recombinant CSDaV isolates as the query sequences based on concatenated nucleotide sequences of the MT, MDR, He, RdRP and CP genomic regions using Simplot. Three CSDaV isolates, VASW23S (a), CR8D (b) and CLBR43S (c), were used as query sequences and two CSDaV isolates were used as reference sequences.....69

Figure 5.1. Schematic diagram showing the strategy used to construct the full-length cDNA clone of CSDaV.....79

Figure 5.2. Electrophoretic pattern from the digestion of the IC-CSDaV-7, IC-CSDaV-9 and IC-CSDaV-20 clones by a single restriction enzyme (RsrII) to confirm the insertion of full-length CSDaV sequence into pJL89 vector.....81

Figure 5.3. Mild symptom detected on non-agroinfiltrated upper leaf of *N. benthamiana* plant after 10 dpi with IC-CSDaV-9 clone (b), compared with non-agroinfiltrated leaf from *N. benthamiana* inoculated only with P19 silencing suppressor (negative control) (a). RT-PCR detection of CSDaV on agroinfiltrated and non-agroinfiltrated upper leaves from *N. benthamiana* inoculated with IC-CSDaV-7 (P7), IC-CSDaV-9 (P9) and IC-CSDaV-20 (P20) clones (c).....82

Figure 5.4. Mild symptoms detected on non-agroinfiltrated upper leaf of citrus plant after 15 dpi of inoculation with IC-CSDaV-9 clone (a and b), compared with non-agroinfiltrated leaf from citrus plant inoculated only with P19 silencing suppressor (negative control) (c). RT-PCR detection of CSDaV on agroinfiltrated and non-agroinfiltrated upper leaves from citrus plant inoculated with IC-CSDaV-7 (P7), IC-CSDaV-9 (P9) and IC-CSDaV-20 (P20) clones (d).....83

Figure S9.1. Bootstrap majority rule (70%) consensus trees reconstructed by the neighbor joining method for five genomic regions of CSDaV isolates including the consensus sequences from transcriptome sequencing of the symptomatic and asymptomatic plants by using Illumina platform. (a): MT segment; (b): MDR segment; (c): He segment; (d): RdRP segment; (e): CP segment.....95

Figure S9.2. Bootstrap majority rule (70%) consensus trees reconstructed by the neighbor joining method for five genomic regions of CSDaV isolates including possible recombinant isolates, field collected and reference sequences. (a): MT segment; (b): MDR segment; (c): He segment; (d): RdRP segment; (e): CP segment.....96

Figure S9.3. Graphical summary showing the conserved domains detected from conserved domain search using the CSDaV AY884005 reference sequence as query in the NCBI Conserved Domain Database (CDD).....97

Figure S9.4. Graphical summary showing the conserved domains detected from conserved domain search using the CSDaV DQ185573 reference sequence as query in the NCBI Conserved Domain Database (CDD).....98

LISTA DE TABELAS

Table 3.1. Citrus plants used to assess the viral sequences by using high-throughput sequencing.....	27
Table 3.2. Read and contig count information of each RNA-seq and sRNA library.....	29
Table 3.3. Contig counts and contig length for each viral specie identified in the BLASTx analysis of the total data set.....	30
Table 3.4. Comparison of the re-assembly data for the two dominant virus species identified in this study (CTV and CSDaV). Read counts from the simultaneous re-assembly analysis are shown for the three assumed predominant CTV isolates and for the two CSDaV isolate.....	33
Table 3.5. Comparison of re-assembly data among different viral sequences identified in this study.....	37
Table 3.6. Re-assembly data among different viral sequences identified in this study by mapping reads from asymptomatic and symptomatic combined libraries for comparative analysis.....	45
Table 4.1. Citrus genotypes used to assess the population of CSDaV.....	56
Table 4.2. Primer sequences designed based on five genomic regions of CSDaV genome....	57
Table 4.3. List of CSDaV sequences obtained in this work showing their respective accession numbers in GenBank database.....	59
Table 4.4. Population genetic parameters estimated for five coding regions of CSDaV isolates using the DnaSP and MEGA programs.....	62
Table 4.5. Comparison of number of the CSDaV isolates from symptomatic and asymptomatic plants between the two main phylogenetic groups assessed in this study.....	65
Table 4.6: Comparison of the population genetic parameters estimated for five coding regions of CSDaV isolates between isolates from symptomatic and asymptomatic plants using the DnaSP and MEGA programs.....	66
Table 4.7. Amino acid changes in five CSDaV genomic regions in isolates obtained from symptomatic citrus plants compared to isolates obtained from asymptomatic citrus plants...	66
Table 5.1. Primers used in the construction of full-length cDNA clones of CSDaV.....	77
Table S9.1: Primer sequences designed based on de novo-assembled contigs to validation assays.....	99
Table S9.2: Accession numbers of the reference sequences used in the phylogenetic analysis.....	100

Table S9.3: Query coverage and maximum amino acid identity of the viruses found in this work obtained from the BLASTx analysis against to the viral database using assembled contigs as query sequences.....105

Table S9.4. Description of domains detected from conserved domain search using the CSDaV AY884005 reference sequence as query.....107

Table S9.5. Description of domains detected from conserved domain search using the CSDaV DQ185573 reference sequence as query.....109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos gerais da citricultura e sua importância econômica para o Brasil	14
1.2. Da tristeza dos citros à morte súbita dos citros	15
1.3. Aspectos gerais da morte súbita dos citros, sintomatologia e etiologia da doença	17
1.4. Situação atual da morte súbita dos citros e novas estratégias para o estudo da doença	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos gerais	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. CAPÍTULO I:	23
Deep Sequencing Analysis of RNAs from Citrus Plants Grown in Citrus Sudden Death-affected Regions Reveals Diverse Known and Putative Novel Viruses	23
3.1. Introduction	25
3.2. Methods	26
3.3. Results	29
3.4. Discussion	48
3.5. Acknowledgements	51
4. CAPÍTULO II:	52
Genetic Structure and Molecular Variability Analysis of Citrus Sudden Death-Associated Virus Isolates from Plants Affected by Citrus Sudden Death in Brazil Reveals a Genetic Clade Associated with this Citrus Disease	52
4.1. Introduction	54
4.2. Materials and Methods	55
4.3. Results	59
4.4. Discussion	70
4.5. Acknowledgments	73
5. CAPÍTULO III:	74
Brief Report of the Construction of Full-Length cDNA Clone of <i>Citrus Sudden Death-Associated Virus</i>	74
5.1. Introduction	76
5.2. Methods	77
5.3. Results	81
5.4. Discussion	84

5.5. Acknowledgements	85
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9. APÊNDICES E MATERIAL SUPLEMENTAR.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da citricultura e sua importância econômica para o Brasil

Considerando o valor comercial e nutricional, o gênero *Citrus* representa uma das mais importantes culturas frutíferas do mundo (SINGH; RAJAM, 2009). Diversos registros indicam que essa cultura teve origem na China e no Sudeste Asiático, onde foi cultivada por mais de 4.000 anos (NEVES et al., 2010; SINGH; RAJAM, 2009), e de onde se dispersou para outras regiões do mundo, atingindo mais de 140 países (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012). Entretanto, as melhores condições para o desenvolvimento das espécies do gênero *Citrus* foram encontradas em regiões tropicais e subtropicais, sendo as laranjas, os limões, as limas, as toranjas e as tangerinas, os principais exemplos de citros cultivados nestas regiões (ARTUR; FRANCISCO, 2014; LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012).

Introduzidas no Brasil logo no início da colonização, as plantas de citros expandiram-se por grande parte do território nacional, sendo cultivadas, principalmente, nos estados do Pará, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ARTUR; FRANCISCO, 2014; IBGE, 2016; NEVES et al., 2010), fato que coloca o Brasil entre os maiores produtores de citros do mundo, juntamente com China, Estados Unidos, Índia, México e Espanha (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012; USDA, 2016). No entanto, foi com a laranja doce que o Brasil conseguiu reconhecimento mundial, atingindo a primeira colocação no *ranking* de produção, e se destacando como maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado do mundo (ARTUR; FRANCISCO, 2014; USDA, 2016). Com, aproximadamente, 700 mil hectares atuais de área plantada, o Brasil produziu cerca de 16 milhões de toneladas de laranjas na última safra, o que representa mais de 30% de toda a produção mundial (IBGE, 2016), além de ter sido responsável por mais da metade de toda a produção de suco de laranja do mundo ($\approx 54,6\%$), o qual foi praticamente todo destinado a exportação (USDA, 2016), gerando lucros indiscutíveis para o país.

Embora diferentes Estados brasileiros tenham contribuído significativamente com o rendimento total na produção de laranja, a maior contribuição vem do Estado de São Paulo, que conta com quase 450 mil hectares de área plantada e foi responsável por, aproximadamente, 73% da produção nacional na última safra (IBGE, 2016). Dada a

importância desse Estado para a citricultura brasileira, e a alta suscetibilidade das plantas de laranja ao ataque de diferentes pragas e doenças (SINGH; RAJAM, 2009), a persistência de diversos problemas fitossanitários nesta região ainda é considerada uma grande ameaça para a citricultura do país. Doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), pinta-preta, leprose, cancro cítrico e o *huanglongbing* (HLB) representam problemas ainda não completamente resolvidos, gerando preocupação e aumento de custo de produção para os citricultores (SINGH; RAJAM, 2009).

1.2. Da tristeza dos citros à morte súbita dos citros

Além das doenças citadas acima, uma das mais devastadoras doenças que atingiu a cultura de citros no Brasil e no mundo foi a denominada tristeza dos citros, causada pelo vírus de mesmo nome, CTV (*Citrus tristeza virus*) (SINGH; RAJAM, 2009). O CTV é um vírus limitado às células do floema, membro da família *Closteroviridae* e gênero *Closterovirus*. Possui um genoma de RNA fita simples e senso positivo, com aproximadamente 19,3 Kb de comprimento. Seu genoma é organizado em 12 *Open Reading Frames* (ORFs) e duas regiões não-transcritas, localizadas nas regiões 5' e 3' terminais (DAVINO et al., 2013). A ORF1 (1a e 1b) é traduzida diretamente do RNA genômico e expressa uma poliproteína relacionada com a replicação do genoma viral (DAVINO et al., 2013). As demais ORFs são expressas através dos RNAs subgenômicos 3' coterminais e codificam as proteínas p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20, p23 e p33, requeridas para diferentes atividades, como montagem do virion, movimento célula-a-célula, supressão do silenciamento de genes e invasão ao hospedeiro (FOLIMONOVA, 2013; MORENO et al., 2008).

Dependendo da variedade copa, do porta-enxerto e do haplótipo ou mistura de haplótipos de CTV, a tristeza dos citros pode se manifestar através de diferentes sintomas, como amarelecimento das plântulas (típico de plântulas de laranja Azeda, toranjas e limões), caneluras no lenho, baixa produtividade e qualidade dos frutos (independente do porta-enxerto utilizado) e declínio rápido (atingindo, principalmente, laranjas doces enxertadas sobre o porta-enxerto laranja Azeda) (DAVINO et al., 2013). No século passado, a tristeza dos citros foi responsável pela perda (morte ou improdutividade) de mais de 100 milhões de pés de laranjas ao redor do mundo (BOVÉ; AYRES, 2007). No Brasil, entre os anos de 1940 e 1950, nove entre onze milhões de plantas de laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osb.) enxertadas sobre o porta-enxerto laranja Azeda (*Citrus aurantium*), principal porta-enxerto

utilizado naquela época em pomares no Estado de São Paulo, foram afetadas pela doença; evento este que quase destruiu a citricultura paulista (ROMÁN et al., 2004). Acredita-se que o CTV tenha se originado na China e atingido outros países citrícolas através da propagação de borbulhas infectadas (MORENO et al., 2008), enquanto que a disseminação local entre plantas ocorre por afídeos vetores, sendo o pulgão preto (*Toxoptera citricida*) considerado o principal e mais eficiente vetor de CTV no Brasil (MORENO et al., 2008).

Diante de todo o prejuízo causado pela tristeza dos citros e afim de retomar a citricultura no Brasil, a principal região citrícola do país que compreende o Estado de São Paulo e a região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, foi submetida à algumas mudanças (BOVÉ; AYRES, 2007), como o uso da proteção cruzada ou pré-imunização com complexos fracos e protetivos de CTV, e a substituição do porta-enxerto laranja Azeda, largamente cultivada nesta região e considerada suscetível a tristeza dos citros (BOVÉ; AYRES, 2007; COSTA et al., 2010). A combinação laranja doce enxertada sobre o porta-enxerto laranja Azeda foi substituída por combinações mais tolerantes à doença, utilizando-se de porta-enxertos alternativos, como o limão Cravo (*Citrus limonia* Osb), limão Volkameriano (*Citrus volkameriana*), Cleopatra mandarin (*Citrus reshni*), Sunki mandarin (*Citrus sunki*), limão Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) e *Poncirus trifoliata* e seus híbridos (citranges e citrumelos) (BOVÉ; AYRES, 2007). No entanto, foi com o limão Cravo que a região citrícola foi reestabelecida. Este porta-enxerto tornou-se largamente utilizado, principalmente devido suas características agrônômicas importantes, como compatibilidade com todas as variedades copa, precocidade, alta produção na copa e tolerância à seca (POMPEU JUNIOR, 2001). Até o ano de 2000, 85% das laranjas doces na principal região citrícola do país estavam enxertados sobre o porta-enxerto limão Cravo (BOVÉ; AYRES, 2007).

Tendo em vista a importância do limão Cravo no Brasil, a identificação, em 1999, de plantas de laranja doce sobre este porta-enxerto com uma nova sintomatologia de declínio rápido seguido de morte da planta, tornou-se uma nova ameaça à citricultura brasileira (CANTÚ et al., 2008; ROMÁN et al., 2004). A nova doença foi denominada de morte súbita dos citros (MSC) (MÜLLER et al., 2002) e foi responsável, entre os anos de 2001 e 2010, pela morte ou erradicação de cerca de quatro milhões de pés de laranja na principal região citrícola do Brasil (MACHADO et al., 2004; GOMES et al., 2008; NEVES et al., 2010).

1.3. Aspectos gerais da morte súbita dos citros, sintomatologia e etiologia da doença

As primeiras plantas sintomáticas para MSC foram identificadas em alguns municípios do sudoeste do Estado de Minas Gerais (Comendador Gomes, Frutal e Uberlândia) e norte do Estado de São Paulo (Altair, Barretos, Colômbia e Guaraci) (BASSANEZI et al., 2003). Plantas com MSC apresentam sintomas de declínio generalizado, caracterizado por folhas de coloração verde-pálida em toda a copa, diferentes níveis de desfolha, ausência de novos brotos e morte do sistema radicular, resultantes, principalmente, da degeneração do floema (MACCHERONI et al., 2005; ROMÁN et al., 2004). Porém, o sintoma mais característico da doença, e que tem sido utilizado como diagnóstico, é a presença de uma coloração amarelada na região cambial do porta-enxerto (CANTÚ et al., 2008; MÜLLER et al., 2002). A gravidade dos sintomas aumenta quando a demanda de água é alta, e a morte das plantas pode ocorrer entre 1 a 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, dependendo da estação do ano e da variedade da planta (MACCHERONI et al., 2005). A princípio, foram observados sintomas de MSC em plantas de laranja Westin, Hamlin, Natal, Valência, Pera e Rubi, todas enxertadas sobre limão Cravo (BASSANEZI et al., 2003). No entanto, observações subsequentes revelaram que laranjas doces sobre o porta-enxerto limão Volkameriano também são suscetíveis à doença (ROMÁN et al., 2004). Outros porta-enxertos, como tangerinas Cleópatra e Sunki e *Poncirus trifoliata* e seus híbridos (citranges e citrumelos) tem se mostrado tolerantes a MSC (MACHADO et al., 2004).

O principal desafio no controle e estudo da MSC tem sido a identificação do seu agente causal. Várias hipóteses foram levantadas a respeito da sua etiologia, no entanto, essa questão ainda não está completamente resolvida (GOMES et al., 2008). Fatores abióticos, como estresse ambiental e/ou nutricional e manejo inadequado do pomar, foram desconsiderados quando pomares bem conduzidos começaram a apresentar plantas com sintomas da doença (MACHADO et al., 2004). Além disso, o fato da MSC ter sido transmitida por união de tecidos reforçava a hipótese de que um agente biótico estaria associado à doença (YAMAMOTO et al., 2011). Alguns patógenos conhecidos de solo, como *Phytophthora*, *Fusarium* e nematóides, foram colocados em segundo plano, já que suas populações eram baixas em talhões com alta incidência de plantas com MSC (MACHADO et al., 2004). Bactérias e fitoplasmas também foram excluídas em razão dos sintomas e da ausência desses patógenos nas plantas afetadas (MÜLLER et al., 2002). A hipótese de serem viróides também foi desconsiderada, principalmente, pela forma de transmissão desses

patógenos não ser consistente com a observada em plantas com MSC (MÜLLER et al., 2002). Diante dessas observações e baseado nos sintomas e distribuição espacial e temporal da doença, a hipótese de que a MSC seja uma doença viral, possivelmente transmitida por um inseto vetor, é considerada a mais provável (BASSANEZI et al., 2003).

Na busca por um agente viral causador dos sintomas de MSC, estudos demonstraram que o padrão espacial e temporal de plantas afetadas pela doença eram notavelmente semelhantes à disseminação do CTV (BASSANEZI et al., 2003). Além disso, verificou-se que a MSC se assemelha a tristeza dos citros quanto aos sintomas, características epidemiológicas (BASSANEZI et al., 2003), e características anatômicas (ROMÁN et al., 2004), o que levou os pesquisadores a sugerirem que a nova doença pudesse ser causada por um novo variante de CTV (BASSANEZI et al., 2003; BOVÉ; AYRES, 2007). No Brasil, o vírus da tristeza pode ser encontrado como populações mistas de haplótipos em todas as espécies e variedades de citros devido ao seu caráter endêmico e à transmissão generalizada pelo pulgão preto (MÜLLER et al., 2002; SOUZA, 2002). No entanto, a possibilidade de novos variantes de CTV desenvolverem sintomas em plantas de citros previamente consideradas tolerantes ao vírus, sempre foi preocupante. TARGON et al. (2003) e RIVAS-VALENCIA et al. (2008) caracterizaram a estrutura populacional de isolados de CTV, em plantas com e sem sintomas de MSC, através da análise do gene da capa proteica do vírus. A estrutura populacional de CTV se mostrou heterogênea para os dois grupos de plantas, e não foi identificado nenhum padrão dominante de CTV em plantas com MSC. A variabilidade genética do CTV, em plantas com e sem sintomas de MSC, também foi estudada a partir de análises dos genes RdRP e HSP70h do vírus (GOMES et al., 2008). Apesar da sintomatologia, as plantas apresentaram-se co-infectadas com variantes de CTV similares (GOMES et al., 2008). Esses resultados não conclusivos tem dificultado a identificação de uma associação clara entre isolados de CTV e MSC.

Em 2005, na busca por novos variantes de CTV em plantas afetadas pela MSC, um novo vírus, membro do gênero *Marafivirus* (família *Tymoviridae*) foi descrito como associado à doença, e denominado de CSDaV (*Citrus sudden death-associated vírus*) (MACCHERONI et al., 2005). MACCHERONI et al. (2005) verificaram a presença desse vírus em 99,7% das plantas analisadas com sintomas da doença, não detectando-o em plantas crescidas em regiões geográficas mais afastadas do local de incidência. O CSDaV é constituído por uma fita simples de RNA, senso positivo e com um tamanho de aproximadamente 6,8 Kb (MACCHERONI et al., 2005). Assim como o CTV, é um vírus limitado ao floema, e possui

um genoma organizado por duas ORFs. A ORF1 compreende quase todo o genoma do vírus (p240) e é gerada a partir do RNA genômico, apresentando domínios proteicos conservados para metiltransferase, protease, helicase, RdRp e a maior das duas proteínas do capsídeo (p22,5), sendo a menor delas (p21) codificada pelo RNA sub-genômico na região 3' coterminar. A ORF2, na região 3' terminal, é uma ORF pequena (p16) que parece codificar para uma proteína semelhante a proteína de movimento de um membro do gênero *Maculavirus*, também da família *Tymoviridae* (MACCHERONI et al., 2005). A presença do CSDaV também foi detectada em três espécies de pulgões vetores de CTV (*Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii* e *A. spiraecola*) (MACCHERONI et al., 2005; SANTOS, 2011). No entanto, devido a diversas dificuldades em se estudar esse patossistema, o postulado de Koch para o CSDaV ainda não foi cumprido. Tentativas de purificação e transmissão somente do CSDaV para plantas de citros, assim como tentativas de construção de um clone infeccioso de CSDaV, não geraram resultados satisfatórios (SANTOS, 2011; NUNES, 2009). Desta forma, a associação do CSDaV com a MSC continua não completamente elucidada (CANTÚ et al., 2008).

1.4. Situação atual da morte súbita dos citros e novas estratégias para o estudo da doença

Como relatado até aqui, a etiologia da MSC não está completamente elucidada, principalmente em função das dificuldades de purificação, transmissão e caracterização dos vírus potencialmente associados à doença. A perda de aproximadamente quatro milhões de plantas de laranja entre os anos de 2001 e 2010 e a forma rápida com que a doença se espalhou entre os municípios dos Estados de Minas Gerais e São Paulo neste mesmo período (GOMES et al., 2008), levaram os citricultores da principal região citrícola do país a tomarem algumas medidas de contenção para o controle da doença. A comercialização e o trânsito de materiais vegetativos (mudas, borbulhas, porta-enxertos e sementes) produzidos a céu aberto e procedentes das áreas de ocorrência da doença foram proibidos (PORTARIA CDA-9, 2002). Entretanto, a medida mais eficiente para a superação do problema foi a substituição do porta-enxerto limão Cravo por porta-enxertos considerados tolerantes à MSC, como, principalmente, tangerine Sunki e citrumelo Swingle (POMPEU JÚNIOR; BLUMER, 2008). Embora a MSC tenha se tornado um problema controlável, todos os porta-enxertos utilizados em substituição ao limão Cravo exigem irrigação, o que acabou aumentando o custo de produção para o citricultor.

Essas sucessivas trocas de porta-enxertos, afim de impedir o desenvolvimento de determinadas doenças, o não conhecimento do agente etiológico definitivo da MSC, e a detecção de sintomas de MSC em plantas de laranjas doces enxertadas sobre diferentes porta-enxertos, até então não considerados suscetíveis à doença, como limão Rugoso (*Citrus jambiri*), Sunki da China (*Citrus sunki*) e *Citrus pennivisiculata* Lush (comunicação pessoal - não publicado), geram preocupações com relação ao futuro da citricultura no país. Poderia o agente causal da MSC começar a desenvolver sintomas em plantas consideradas tolerantes à doença? Desta forma, é clara ainda a necessidade de se confirmar a etiologia viral e entender a real função dos vírus atualmente associados a doença.

Grande parte dos estudos envolvendo plantas afetadas pela MSC utilizaram estratégias convencionais, como ELISA (*enzyme-linked immnosorbet assay*) e RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), para detecção dos vírus putativamente associados à doença (TARGON et al., 2003; GOMES et al., 2008; RIVAS-VALENCIA et al., 2008; SANTOS, 2011). No entanto, esses métodos tradicionais de detecção dependem de um conhecimento prévio do genoma viral, sendo altamente específicos e excluindo a identificação de outros vírus conhecidos e não conhecidos (COETZEE et al., 2010; LI et al., 2012), o que pode, possivelmente, gerar resultados não precisos quanto ao estado etiológico da planta estudada (LI et al., 2012). A estratégia de sequenciamento por *shotgun*, realizada por MACCHERONI et al. (2005), de plantas com sintomas de MSC e que resultou na identificação do CSDaV, gerou um baixo número de *reads*, o que dificultou o estudo da frequência dos vírus detectados, a diferenciação dos virus com alta diversidade genética e a identificação de outros novos vírus. Diante disso, o uso de novas metodologias eficientes na identificação e caracterização das populações de vírus que possam estar presentes e associados à plantas afetadas pela MSC, assim como o estudo da diversidade genética de populações de vírus já associados à doença (CTV e CSDaV) e dos fatores envolvidos na diversidade e na estrutura populacional desses vírus, são fundamentais para um melhor entendimento desse patossistema e, consequentemente, para a escolha de estratégias mais eficazes para o controle da doença.

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*) tem sido amplamente utilizada, com sucesso, na detecção e caracterização de vírus já conhecidos e não conhecidos em plantas hospedeiras (JO et al., 2015; LI et al., 2012; PRABHA; BARANWAL; JAIN, 2013). O sequenciamento de alta performance do transcriptoma total (RNA-seq) e dos pequenos RNAs (sRNAs) de plantas, especialmente com

uma etiologia viral desconhecida, tem demonstrado ser uma abordagem poderosa e promissora na detecção de ambos os vírus de RNA e DNA (LI et al., 2012; NOURI et al., 2016), principalmente, pelo fato do sequenciamento de transcriptoma e de sRNAs permitirem o acesso à maioria dos RNAs expressos e aos sRNAs derivados do mecanismo de defesa das plantas contra vírus, respectivamente (LI et al., 2012; NOURI et al., 2016). O presente trabalho utilizou da tecnologia de sequenciamento de nova geração para um estudo geral das populações de vírus presentes em plantas de citros crescidas numa região afetada pela MSC, através do sequenciamento de transcriptoma e de sRNAs. Os dados gerados permitiram o acesso às populações de vírus mais e menos predominantes e a comparação da frequência dos vírus identificados entre plantas sintomáticas e assintomáticas para a MSC, o que também serviu de base para um estudo mais específico de diversidade genética e construção de um clone infeccioso de CSDaV.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As abordagens utilizadas neste trabalho permitiram um estudo das populações de vírus presentes em plantas de citros cultivadas numa região afetada pela morte súbita dos citros (MSC). O sequenciamento de alta performance, combinando dados de RNA-seq e de pequenos RNAs, foi eficiente para revelar a ocorrência de uma infecção viral mista, incluindo, predominantemente, os dois vírus previamente associados à MSC, *Citrus tristeza virus* (CTV) e *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV), e um vírus endógeno de citros, *Citrus endogenous pararetrovirus* (CitPRV), até então não identificado em plantas de citros no Brasil. Também foi possível identificar vírus menos predominantes (0,13% dos *reads* totais), os quais permitiram a caracterização parcial do genoma de dois possíveis novos vírus, denominados nesse estudo como *Citrus jingmen-like virus* (CJLV) e *Citrus virga-like virus* (CVLV). A estratégia de sequenciamento também contribuiu com as análises de diversidade genética, permitindo a identificação de dois genótipos diferentes de CTV, filogeneticamente associados aos grupos severos RB e VT, e dois genótipos diferentes de CSDaV. Assim como em trabalhos anteriores, não foi possível fazer uma associação entre os genótipos de CTV encontrados e a MSC. No entanto, a distribuição dos *reads* sobre o genoma de referência de CTV indicam que *reads* derivados de plantas assintomáticas parecem se concentrar na região do gene p20, relacionado com a supressão de silenciamento dos genes, já *reads* derivados de plantas sintomáticas mostraram ser mais abundantes na região dos genes associados às atividades de interação com o hospedeiro (p13, p18 e p33). Embora não conclusivos, tais resultados geram novas questões sobre uma possível função(ões) desses genes no desenvolvimento da MSC. As análises comparativas, correlacionando a frequência dos vírus com a presença ou ausência de sintomas de MSC, indicaram uma possível associação entre CitPRV e plantas sintomáticas e uma forte associação entre os novos vírus identificados neste estudo (CJLV e CVLV) e plantas assintomáticas, resultados estes que geram novas questões sobre as funções desses vírus nas plantas de citros estudadas. No entanto, a abordagem deste estudo indicou, assim como em outros trabalhos, o CSDaV como o vírus mais associado a doença, e permitiu identificar, pela primeira vez, um genótipo específico de CSDaV mais associado às plantas sintomáticas. Tais resultados foram verificados através de um estudo mais específico da diversidade do CSDaV. Análises de cinco regiões genômicas de isolados de CSDaV, obtidos de plantas sintomáticas e assintomáticas para MSC, revelaram a

predominância de dois grupos filogeneticamente diferentes, e indicaram, de forma coerente com os resultados obtidos previamente, que um grupo específico está mais associado às plantas sintomáticas. Além disso, essa segunda abordagem demonstrou que o grupo de isolados mais associado às plantas com sintomas apresentou uma maior diversidade genética, comparado com os isolados de plantas assintomáticas, e que a maior diversidade foi verificada para uma região específica, e de função não conhecida, do genoma do vírus. Poderia esta região estar associada a função(ões) de adaptação do vírus tornando-o mais infectivo para a planta? Os resultados obtidos conduziram este trabalho para uma construção de um clone de cDNA do CSDaV, a ser utilizado em futuros estudos de função do vírus e etiologia da doença. Embora ainda não seja possível definir de forma conclusiva o agente causal da MSC, as abordagens utilizadas neste trabalho geraram importantes e novas informações com relação a esse patossistema e vírus envolvidos, as quais devem ser levadas em consideração em estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHOLA, T.; DEN BOON, J.A.; AHLQUIST, P. Helicase and Capping Enzyme Active Site Mutations in Brome Mosaic Virus Protein 1a Cause Defects in Template Recruitment, Negative-Strand RNA Synthesis, and Viral RNA Capping. *Journal of Virology*, v. 74, p. 19, 8803-8811, 2000.
2. ALBIACH-MARTI, M. R. The Complex Genetics of Citrus tristeza virus. **Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications**, p. 1–26, 2013.
3. ALE-AGHA, G.N.; RAKHSHANDEHROO, F. Detection and Molecular Variability of Fig Fleck-Associated Virus and Fig Cryptic Virus in Iran. *J Phytopathol*, v. 162, p. 417-425, 2013.
4. ALI, A.; ROOSSINCK, M.J. Genetic bottlenecks. In **Plant Virus Evolution.**, Editor Roossinck, M.J., Eds.; Publisher: Springer Berlin Heidelberg, Germany; p. 123–131, 2008.
5. AL RWAHNIH, M.; DAUBERT, S.; GOLINO.; D AND ROWHANI, A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms

- reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. **Virology**, v. 387, p. 395-401, 2009.
6. AMBRÓS, S.; RUIZ-RUIZ, S.; PEÑA, L.; MORENO. A genetic system for citrus tristeza virus using the non-natural host *nicotiana benthamiana*: An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. JUL, p. 1–14, 2013.
 7. ARNOLD, J. J.; CAMERON, C.E. Structure-Function Relationships Among RNA-Dependent RNA Polymerases. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 320, p. 137–156, 2008.
 8. BARROS, C.C.P. **Sequenciamento do genoma completo e expressão heteróloga da capa protéica do Marafivirus associado a morte súbita dos citros**. 2006. Dissertation, Universidade Católica de Brasília; Brasília-BR, 2006.
 9. BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R. et al. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, v. 93, n. 16, p. 502–512, 2003.
 10. BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; SANCHES, A. L.; SPÓSITO, M. B.; STUCHI, E. S. et al. Effect of Citrus Sudden Death on Yield and Quality of Sweet Orange Cultivars in Brazil. **Plant Disease**, v. 91, n. 11, p. 1407–1412, 2007.
 11. BEKAL, S.; DOMIER, L. L.; GONFA, B.; MCCOPPIN, N. K.; LAMBERT, K. N.; BHALERAO, K. A novel flavivirus in the soybean cyst nematode. **Journal of General Virology**, v. 95, n. PART 6, p. 1272–1280, 2014.
 12. BEKESIOVA, I.; NAP, J. P AND MLYNAROVA, L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. **Plant Mol. Biol. Repr**, v. 17, p. 269-277, 1999.
 13. BOVÉ, J. M.; AYRES, A. J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB life**, v. 59, n. 4–5, p. 346–354, 2007.
 14. BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. **Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization**. [s.l: s.n.]. v. 7
 15. CANTÚ, M. D.; MARIANO A. G.; PALMA, M. S.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. Proteomic analysis reveals suppression of bark chitinases and proteinase inhibitors in citrus plants affected by the citrus sudden death disease. **Phytopathology**, v. 98, n. 10,

- p. 1084–1092, 2008.
16. COETZEE, B.; FREEBOROUGH, M. J.; MAREE, H. J.; CELTON, J. M.; REES, D. J. G.; BURGER, J. T. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. **Virology**, v. 400, n. 2, p. 157–163, 2010.
 17. COSTA, A. T.; NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A.; MÜLLER, G. A. Stability of Citrus tristeza virus protective isolates in field conditions. **Program**, n. 1, p. 693–700, 2010.
 18. DAVINO, S. WILLEMSSEN, A.; PANNO, S.; DAVINO, M.; CATARA, A.; ELENA, S. F.; RUBIO, R. Emergence and Phylodynamics of Citrus tristeza virus in Sicily, Italy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
 19. FOLIMONOVA, S. Y. Developing an understanding of cross-protection by citrus tristeza virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. APR, p. 1–9, 2013.
 20. GAO, R.; TIANB, Y. -P.; WANGA, J.; YINA, X.; LIA, X. -D. et al. Construction of an infectious cDNA clone and gene expression vector of Tobacco vein banding mosaic virus (genus Potyvirus). **Virus Research**, v. 169, n. 1, p. 276–281, 2012.
 21. GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 39, p. 157-186, 2001.
 22. GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nat Biotech**, v. 29, p. 644-652, 2011.
 23. GOMES, C. P. C.; NAGATA, T.; JESUS JR, W. C.; BORGES NETO, C. R.; PAPPAS JR, G. J. et al. Genetic variation and recombination of RdRp and HSP 70h genes of Citrus tristeza virus isolates from orange trees showing symptoms of citrus sudden death disease. **Virology journal**, v. 5, p. 9, 2008.
 24. HAMMOND, R.W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 3153-3159, 1997.
 25. HARPER, S. J. Citrus tristeza virus: Evolution of complex and varied genotypic groups. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. APR, 2013.
 26. **IBGE**. Indicadores IBGE - Estatística de produção agrícola, 2016.
 27. JO, Y.; CHOI, H.; CHO, J. K.; YOON, J. Y.; CHOI, S. K.; CHO, W. K. In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome

- data. **Scientific reports**, v. 5, p. 15841, 2015.
28. JRIDI, C.; MARTIN, J.F.; MAREIE-JEANNE, V.; LABONNE, G.; BLANC, S. Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. **J Virol**, v. 80, p. 2349-2357, 2006.
 29. KONG, P.; RUBIO, L.; POLEK, M.; FALK, W.B. Population Structure and Genetic Diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) Isolates. **Virus Genes**, v. 21, p. 139-145, 2000.
 30. KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. **Bioinform**, v. 5, p. 150-163, 2004.
 31. LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.
 32. LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451–1452, 2009.
 33. LI, R.; GAO, S.; HERNANDEZ, A. G.; WECHTER, W. P.; FEI, Z.; LING, K. S. Deep sequencing of small RNAs in tomato for virus and viroid identification and strain differentiation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012.
 34. LI, H., ROOSSINCK, M.J. Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. **J. Virol**, v. 78, p. 10582-10587, 2004.
 35. LIN, S. S.; ROGER, F. H.; YEH, S. D. Construction of in vivo and in vitro infectious transcripts of a Taiwan strain of Zucchini yellow mosaic virus. Bot. Bull. **Acad. Sin**, v. 43, p. 261-269, 2002.
 36. LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 6, p. 530–545, 2012.
 37. LOCKHART, B. E., MENKE, J., DAHAL, G. AND OLSZEWSKI, N.E. Characterization and genomic analysis of tobacco vein clearing virus, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. **J. Genet. Virol**, v. 81, p. 1579–1585, 2000.
 38. LOLE, S.; BOLLINGER, R.C.; PARANJAPE, R.S.; GADKARI, D.; KULKARNI, S.S.; NOVAK, N.G. Ingersoll, R.; Sheppard, H.W.; Ray, S.C. Fulllength human

- immunodeficiency virus Type 1 genomes from subtype C infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J. Virol**, v. 73, p. 152-160, 2009.
39. LÓPEZ-MOYA, J. J.; GARCÍA, J. A. Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. **Virus Research**, v. 68, n. 2, p. 99–107, 2000.
 40. MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F., et al. Identification and Genomic Characterization of a New Virus (Tymoviridae Family) Associated with Citrus Sudden Death Disease Identification and Genomic. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 3028–3037, 2005.
 41. MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. Emerging and Reemerging Virus Diseases of Plants. In Desk encyclopedia of plant and fungal virology, 1st ed.; Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V, eds. Publisher: **Ed. Elsevier**, p. 412-417, 2009.
 42. MOURY, B. Differential Selection of Genes of Cucumber Mosaic Virus Subgroups. **Mol. Biol. Evol**, v. 21, p. 1602-1611, 2004.
 43. MORENO, I.M.; MALPICA, J.M.; DÍAZ-PENDON, J.A.; MORIONES, E.; FRAILE, A.; GARCIA-ARENALA, F. Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. **Virology**, v. 318, p. 451-460, 2004.
 44. MORENO, P.; AMBROS, S.; ALBIACH-MARTI M, R.; GUERRI, J.; PENA, L. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 2, p. 251–268, 2008.
 45. MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J.D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J. et al. Citrus sudden death: a new citrus disease in Brazil. Proceedings of Conference of IOCV, Riverside, US, p. 405-407, 2002.
 46. NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F. et al. O retrato da citricultura brasileira. **CitrusBR**, p. 138, 2010.
 47. NOREEN, F.; AKBERGENOV, R.; HOHN, T.; RICHERT-POGGELER, K. R. Distinct expression of endogenous Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production. **Plant Journal**, v. 50, n. 2, p. 219–229, 2007.
 48. NOURI, S.; AREVALO, R.; FALK, B.W.; GROVES, R.L. Genetic Structure and Molecular Variability of Cucumber mosaic virus Isolates in the United States. **Plos One**, v. 9, 2014.

49. NOURI, S.; SALEM, N.; NIGG, J. C.; FALK, B. W. Diverse Array of New Viral Sequences Identified in Worldwide Populations of the Asian Citrus Psyllid (*Diaphorina citri*) Using Viral Metagenomics. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2434–2445, 2016.
50. NUNES, F. A. C. Construção de cDNA infeccioso de *Citrus sudden death-associated virus*. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade católica de Brasília. 2009.
51. OGAWA, T.; TOMITAKA, Y.; NAKAGAWA, A.; OHSHIMAB, K. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. **Virus Research**, v. 131, p. 199-212, 2008.
52. OLIVEIRA, P. N.; DOVIS, V. L.; MATTOS JÚNIOR, D. Nitrogênio na cultura de citros. In **Informações agronômicas.**, Editor CASARIN, V., n. 19, p. 6-14, 2014.
53. PANTALEO, V.; MOXON, S.; MIOZZI, L.; MOULTON, V.; DALMAY, T.; BURGYAN, J. Identification of grapevine microRNAs and their targets using high throughput sequencing and degradome analysis. **Plant J**, v. 62, p. 960-976, 2010.
54. PRABHA, K.; BARANWAL, V. K.; JAIN, R. K. Applications of next generation high throughput sequencing technologies in characterization, discovery and molecular interaction of plant viruses. **Indian Journal of Virology**, v. 24, n. 2, p. 157–165, 2013.
55. QIN, X.-C.; SHIA, M.; TIANC, J.-H.; LIND, X.-D.; GAOA, D.-Y. et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6744–9, 2014.
56. RIVAS-VALENCIA, P.; LOEZA-KUK, E.; MORA-AGUILERA, G.; FEBRES, V.; OCHOA-MARTÍNEZ, D. et al. Population Structure of Citrus Tristeza Virus Isolates and Its Association. **Agrociencia**, v. 42, n. 1, p. 85–93, 2008.
57. ROMÁN, M. P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O. et al. Sudden Death of Citrus in Brazil: A Graft-Transmissible Bud Union Disease. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 453–467, 2004.
58. ROY, A.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W. L.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H. Population of endogenous pararetrovirus genomes in carrizo citrange. **Genome announcements**, v. 2, n. 1, p. e01063-13, 2014.
59. RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDEZ, A.; POLEK, M. et al.

- Genetic Variation of Citrus Tristeza Virus Isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and Recombination. **Virology**, v. 75, p. 8054-8062, 2001.
60. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed.; Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 61. SANTOS, M. A. **Tentativa de purificação e produção de antissoro contra o vírus da morte súbita dos citros e isolamento de CSDaV em plantas herbáceas**. 2011. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo - Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011.
 62. SEO, J.K.; OHSHIMA, K.; LEE, H.G.; SON, M.; CHOI, H.S. et al. Molecular variability and genetic structure of the population of Soybean mosaic virus based on the analysis of complete genome sequences. **Virology**, v. 393, p. 91-103, 2009.
 63. SINGH, S.; RAJAM, M. V. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 15, n. 1, p. 3–22, 2009.
 64. SOUZA, A. A.; MÜLLER, G. W.; TARGON, M. L.; TAKITA, M. A.; MACHADO, M. A. Stability of the Mild Protective “PIAC” Isolate of Citrus Tristeza Virus. In: Proc. **15th Conference of IOCV**. Riverside, CA. pp: 131-135, 2002.
 65. STACH-MACHADO, D. R., PERONI, L. A., DIAS, L. C. F., CAPORRINO, M. C., MÜLLER, G. W., TARGON, M. L. P. N., MACHADO, M. A. Characterization of monoclonal antibodies for identification of the severe strain of ‘Capão Bonito’ Citrus tristeza virus. In: Proc. **15th Conf. IOCV**, p. 165-171, 2002.
 66. TUO, D.; SHEN, W.; YAN, P.; LI, X.; ZHOU, P. Rapid Construction of Stable Infectious Full-Length cDNA Clone of Papaya Leaf Distortion Mosaic Virus Using In-Fusion Cloning. **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6241–6250, 2015.
 67. **USDA**. Citrus: World Markets and Trade, p. 1–9, 2016.
 68. VILLAMOR, D.E.V.; MEKURIA, T.A.; PILLAI, S.S.; EASTWELL, K.C. High throughput sequencing identifies novel viruses in nectarine: Insights to the etiology of stem pitting disease. **Phytopathology**, v. 106, p. 519-527, 2016.
 69. WALIA, J.J.; WILLEMSSEN, A.; ELCI, E.; CAGLAYAN, K.; FALK, B.F. et al. Genetic Variation and Possible Mechanisms Driving the Evolution of Worldwide Fig mosaic virus Isolates. **Phytopathology**, v. 104, p. 108-114, 2013.
 70. WU G. W, TANG, M., WANG, G. P., WANG, C. X., LIU, Y. et al. The epitope structure of Citrus tristeza virus coat protein mapped by recombinant proteins and

- monoclonal antibodies. **Virology**, v. 448, p. 238–246, 2014.
71. YAMAMOTO, P. T., BASSANEZI, R. B., WULFF, N. A., SANTOS, M. A., SANCHES, A. L. et al. Citrus Sudden Death Is Transmitted by Graft-Inoculation and Natural Transmission Is Prevented by Individual Insect-Proof Cages. **Plant Disease**, v. 95, n. 2, p. 104–112, 2011.
72. ZAVALLO, D.; DEBAT, H. J.; CONTI, G.; MANACORDA, C. A.; RODRIGUEZ, M. C. et al. Differential mRNA accumulation upon early *Arabidopsis thaliana* infection with ORMV and TMV-Cg is associated with distinct endogenous small RNAs level. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–24, 2015.