



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KAREN SUMIRE KUBO

**Expressão gênica diferencial de genótipos de citros em resposta
à infecção do vírus da leprose (CiLV-C)**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular, na área
de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
KAREN SUMIRE Kubo.
M. Machado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS ANTONIO MACHADO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. JULIANA DE FREITAS ASTÚA

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

K951e	<p>Kubo, Karen Sumire, 1980- Expressão gênica diferencial de genótipos de citros em resposta à infecção do vírus da leprose dos citros / Karen Sumire Kubo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadores: Marcos Antônio Machado, Juliana Freitas-Astúa. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Leprose dos citros. 2. Vírus - Identificação. 3. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. 4. Cítricos. 5. Plantas – Defesas. I. Machado, Marcos Antônio. II. Freitas-Astúa, Juliana Freitas. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Differential gene expression of citrus genotypes in response to *Citrus leprosis C* (CiLV-C) infection

Palavras-chave em Inglês:

Citrus leprosis

Vírus - Identification

Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Citrus

Plant defenses

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcos Antônio Machado [Orientador]

Ricardo Harakava

Mariângela Cristofani-Yaly

Alessandra Alves de Souza

Marcelo Ribeiro Alves

Data da defesa: 29-08-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de agosto de 2011

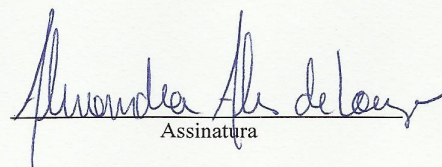
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

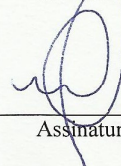


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello

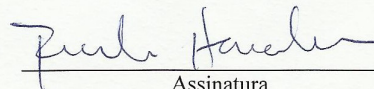
Assinatura

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly



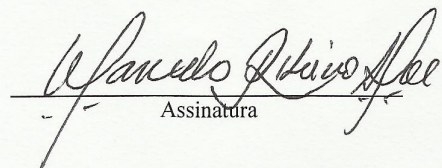
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Harakava



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Ribeiro Alves



Assinatura

Profa. Dra. Ane Hackbart de Medeiros

Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

"No fim dá certo. Se não deu, é porque não chegou ao fim"

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Antônio Machado pela orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra Juliana Freitas-Astúa pela co-orientação e discussões relacionadas à tese e ao meu desenvolvimento profissional.

Ao Dr. Celso Eduardo Benedetti e Dra Alessandra Alves de Souza pelas sugestões valiosas na minha qualificação.

Ao Rodrigo Stuart, pela participação em minha vida profissional e pessoal, sempre de forma positiva. Por me mostrar que sempre existe uma solução. Pelas incontáveis horas dedicadas a instalação de meus experimento biológicos e por me ensinar tudo o que sei sobre proteoma.

Aos meus pais, pela compreensão, apoio e por me mostrar que sempre existe a opção de voltar pra casa.

À minha irmã, por me fazer companhia sempre que possível e por rir das dificuldades, mostrando que pode ser mais fácil do que aparenta.

Aos meus avós pelo exemplo, de que tudo é possível com esforço.

À Valéria Mafra, pela amizade, companhia nas horas em que o laboratório esteve vazio e incrível vontade de fazer as coisas acontecerem. Por conseguir me fazer dar sempre o melhor de mim.

Ao Frank Magno da Costa, por me mostrar que o sucesso profissional existe para quem busca muito. Pela amizade valiosa; pelo auxílio na transferência de 12.600 ácaros, que tomou tantas horas seguidas, que até Deus duvidaria.

Ao Dr Marcelo Ribeiro-Alves, por ter paciência comigo e minhas inúmeras variáveis. Por não dizer que sou um ponto fora da reta.

Ao professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pela orientação no mestrado e discussões.

À Val, Marinês, Mariângela e Andréia pelas idéias e amizade.

Aos meus colegas e amigos de Centro de Citricultura: Gaby, Kelly, Amélia, Sílvia, Juliana B., Beto, Kleber, Thiago, Lígia, Polyana, Kishi, Rosângela, Leonardo, Alex, Paulo, Joadson, Renata, Luciane, Marcela e Fernanda.

Aos meus amigos: Lu, Katinha, Ju, Verena, outra Ju, Ângela, Dri, Beto. Léa, Carla, Rosana, Venância, Paulinho, David, Renata, Fernanda, Du, Diana e Alê.

Às minhas amigas de infância Juliana e Karla, por compreenderem minha falta de participação em suas vidas nos últimos 7 anos, sem nunca me fecharem as portas de volta.

Ao Jhonny Balbino, por me fazer me esforçar ao máximo.

À Nina, Maksoum, Zeus, Gilly Bean, Sony, Daiara e Poty por alegrarem meus dias.

À Cíntia Muraro por me lembrar que é preciso dançar.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. A leprose dos citros.....	5
2.1.1. Histórico.....	5
2.1.2. Sintomas.....	7
2.1.3. Citopatologia.....	8
2.1.4. Genomas dos VTB.....	10
2.2. Mecanismos de resposta de defesa em plantas	12
2.2.1. Mecanismos de sinalização	14
2.2.2. Ácido salicílico	17
2.2.3. Etileno/jasmonato.....	21
2.2.4. Estresse oxidativo	24
2.2.5. Silenciamento gênico	26
2.3. Microarranjos como ferramenta de estudo de interação planta patógeno.....	27
3. Objetivos.....	31
3.1. Geral.....	31
3.2. Específicos	31
4. Organograma de planejamento dos experimentos biológicos.....	33
Capítulo 1	35
5. Detecção de virus transmitidos por Brevipalpus em seus ácaros vetores	35
5.1. Resumo	35
5.2. Abstract	36
5.3. Introdução	37
5.4. Material e Métodos	40
5.4.1. Material biológico.....	40
5.4.2. Extração de RNA e RT-PCR	40
5.5. Resultados e discussões	43
5.6. Conclusão.....	45
Capítulo 2.....	47
6. Expressão gênica diferencial em resposta ao CiLV-C.....	47
6.1. Resumo	47
6.2. Abstract.....	48

6.3. Introdução	49
6.4. Material e métodos.....	50
6.4.1. Experimentos biológicos.....	50
6.4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	53
6.4.3. Análises de expressão em microarranjos	54
6.4.4. Análise estatística.....	55
6.4.5. RT-qPCR.....	56
6.5. Resultados e Discussão	60
6.5.1. Experimentos biológicos – Detecção de partículas virais em ácaros e em plantas.....	60
6.5.2. Extração de RNA e síntese de cDNA	61
6.5.3. Análises de microarranjo	61
6.5.4. Análises de RT-qPCR	69
6.6. Considerações finais	83
6.7. Conclusão.....	86
7. Produção no período	88
7.1. Artigos completos publicados.....	88
7.2. Artigos submetidos	88
7.3. Resumos apresentados em Congressos	89
8. Referências Bibliográficas	91
ANEXO 1	114
Tabela de genes diferencialmente expressos considerando a interação entre EGA: EV obtida a partir de <i>two-way</i> ANOVA e p-valor	114
ANEXO 2	136
Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite-Virus Pathosystem	136
B.....	137

Resumo

O *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) é o agente causal da leprose dos citros, uma doença incomum transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. Uma vez que o CiLV-C permanece confinado em lesões localizadas nas folhas, ramos e frutos sem causar infecção sistêmica, o vetor precisa se alimentar nestas lesões para adquirir o vírus. O objetivo deste trabalho foi analisar os perfis de expressão diferencial entre um genótipo resistente (tangor ‘Murcott’) e um suscetível (laranja ‘Pera’) em resposta à leprose dos citros e identificar os possíveis mecanismos de resistência envolvidos na resistência à doença. Por esse motivo, antes da instalação dos experimentos biológicos, nós aperfeiçoamos a detecção do CiLV-C em seu vetor, para certificação da aquisição viral. O experimento biológico incluiu quatro grupos: genótipo resistente ou suscetível infestados com ácaros virulíferos ou avirulíferos para CiLV-C. Com o intuito de se identificar genes diferencialmente expressos, nós utilizamos lâminas de microarranjo com sondas baseadas na base de dados do Citrus EST (CitEST). As análises estatísticas foram realizadas por *two-way* ANOVA considerando os fatores genótipo e a infecção pelo CiLV-C, de maneira a se encontrar respostas envolvidas na resistência ao CiLV-C. Os resultados foram interpretados por *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Os resultados sugerem que existem *receptor-like proteins* (RLP) e *receptor-like kinase* (RLK) que podem reconhecer o vírus ou o ácaro, ativando uma resposta de defesa baseada na assinatura de Ca^{2+} e ativação da via do ácido salicílico. Estudos adicionais ainda são necessários para verificar se a resposta de defesa pode estar relacionada à resistência sistêmica adquirida (SAR).

Palavras-chave: leprose dos citros, vírus, RT-PCR, citros, respostas de defesa.

Abstract

Citrus leprosis virus C (CiLV-C) is the causal agent of citrus leprosis, an unusual disease transmitted by the mite *Brevipalpus phoenicis*. Since CiLV-C remains confined in localized lesions in leaves, stems and fruits without causing systemic infection, the vector needs to feed in these lesions to acquire the virus. The aim of this work was to analyze the differential gene expression profiles between resistant ('Murcott' tangor) and susceptible ('Pera' sweet orange) citrus genotypes in response to CiLV-C, and to identify possible mechanisms involved in disease resistance. For this reason, before the biological experiments were set, we improved the detection of CiLV-C in the mite vector to ensure virus acquisition. The biological experiment consisted in four groups: susceptible or resistant genotype infested with CiLV-C viruliferous or non-viruliferous mites. In order to identify differentially expressed genes, we used microarray chips designed using the *Citrus EST database (CitEST)*. The statistical analysis was performed by two-way ANOVA considering the genotype and the infection by CiLV-C, aiming to find defense responses against CiLV-C. The results were interpreted by *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* and led to the hypothesis that receptor-like proteins (RLP) and receptor-like kinase (RLK) may recognize the virus or the mite triggering a defense response based on Ca^{2+} signature and activation of Salicylic acid pathway (SA). Further studies are necessary to evaluate if the defense response could be related to the development of systemic acquired resistance (SAR).

Key-words: Citrus leprosis, virus, RT-PCR, citrus, defense response.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, tem na citricultura uma das suas principais atividades do agronegócio, produzindo metade do suco de laranja do planeta. A exportação do suco concentrado congelado gera entre US\$ 1,5 a US\$ 2,5 bilhões, além de 200.000 empregos diretos e indiretos (Neves *et al.*, 2010). No entanto, a produtividade da citricultura brasileira ainda é relativamente baixa, em grande parte devido a problemas de ordem fitossanitária, com o controle de pragas e doenças, representando mais de 60% dos custos de produção. Somente a utilização de acaricidas gerou 1,7% do faturamento do setor de defensivos e, no setor da citricultura, representou 39% do investimento (Neves *et al.*, 2010).

Várias doenças de etiologia viral causaram alterações importantes na citricultura. A Tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV), por exemplo, causou uma troca massiva dos porta-enxertos de laranja azeda pelos de limão cravo na década de 50. Mais atualmente, a Morte súbita, ainda de agente etiológico desconhecido, causou a diminuição do uso dos porta-enxertos de limão-cravo em áreas afetadas pela doença. A leprose dos citros é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), transmitida pelo ácaro Tenuipalpeo *Brevipalpus phoenicis*. Esta doença tem sido considerada a doença viral de maior importância econômica para a citricultura paulista, justamente devido aos custos associados ao controle do ácaro vetor.

A leprose afeta especialmente laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], com mais de 60% dos pomares paulistas apresentando plantas com sintomas da doença (Salva e Massari, 1995). No entanto, sintomas característicos podem ocorrer em diferentes níveis, em praticamente todas as espécies e variedades de *Citrus* (Bitancourt,

1955; Roessing e Salibe, 1967). De uma maneira geral, limões, limas doces e tangerinas são considerados mais resistentes e/ou tolerantes à leprose, enquanto laranjas doces têm se mostrado altamente suscetíveis.

Os sintomas da leprose dos citros consistem em lesões locais cloróticas ou necróticas, lisas ou salientes, que aparecem cerca de 17 a 60 dias após a transmissão do vírus pelo ácaro nas folhas, frutos e ramos (Bassanezi *et al.*, 2002). Dependendo do número de lesões e da época de aparecimento dos sintomas, esses podem incluir intensa desfolha na planta e queda prematura de frutos.

Alguns autores observaram que o tangor ‘Murcott’ (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck), um híbrido de laranja doce com tangerina, apesar de permitir a colonização do vetor, não desenvolve sintomas de leprose (Chiavegato *et al.*, 1982; Boaretto e Chiavegato, 1994; Rodrigues, 1995), possivelmente por ter herdado resistência e/ou tolerância das tangerineiras. Porém, apesar das constatações de campo, pouco se conhece até o momento sobre a herança genética da doença (Bastianel *et al.*, 2009).

Embora haja genótipos resistentes ou com alta tolerância, ainda são desconhecidos os mecanismos envolvidos na resposta da interação planta/vírus. Além da possibilidade de estudo da herança da resistência através de mapeamento genético, abordagens de estudo de genes diferencialmente expressos, tanto em genótipos resistentes quanto naqueles tolerantes, representa uma alternativa para a avaliação de mecanismos moleculares envolvidos na resistência/tolerância à leprose dos citros.

As plantas respondem de modo complexo aos estresses bióticos e abióticos, entretanto, existem ainda poucos estudos que tentam elucidar suas respostas aos patossistemas complexos (Freitas-Astúa *et al.*, 2007).

As bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*) são úteis na busca de genes diferencialmente expressos e que podem ser associados ao fenótipo de resistência ou suscetibilidade de organismos de genoma desconhecido. Essas bibliotecas são atrativas porque independem de dados de sequenciamento previamente estabelecidos do organismo (Adams *et al.*, 1991). Ainda, técnicas auxiliares, como a hibridização subtrativa sucessiva, podem ser utilizadas para enriquecer sequências alvo que estejam mais estritamente associadas à resposta da planta (Sargent, 1987).

O trabalho de sequenciamento para formar uma biblioteca de respostas diferenciais a diferentes patógenos como *Xylella fastidiosa* (Souza *et al.*, 2007), *Citrus tristeza virus* (Cristofani-Yaly *et al.*, 2007) e *Citrus leprosis virus C* (Freitas-Astúa *et al.*, 2007), foi realizado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, formando a base de dados chamada de Citrus ESTs (CitEST). Os ESTs são sequências parciais clonadas a partir de uma biblioteca de cDNA, que podem ser utilizadas na identificação de sequências únicas com o intuito de estudar suas funções (Adams *et al.*, 1991; Mekhedov *et al.*, 2000). Os cDNAs identificados em uma biblioteca de ESTs podem ser utilizados para a montagem de lâminas de microarranjos para a realização de estudos funcionais (Shim *et al.*, 2004). Esta técnica é comum desde o final da década de 90, entretanto alguns problemas como hibridizações cruzadas podem ocorrer, acarretando em interpretações equivocadas. Para evitar este erro, em lâminas comerciais, os dados de EST são geralmente ressequenciados antes de sua utilização (Richmond e Somerville, 2000).

Tanto nas técnicas com ESTs, como na *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH), a identificação e caracterização de genes regulados em resposta a uma condição é realizada individualmente ou em pequenos grupos. Já a técnica de microarranjo,

permite análise simultânea de grande número de genes em resposta a uma condição específica.

Os microarranjos já foram utilizados para avaliar resposta a deficiência nutricional (Chen *et al.* 2002; O'Rourke *et al.*, 2009, Forner-Giner *et al.*, 2010), ritmo circadiano (Schaffer *et al.* 2001; Covington *et al.*, 2008) e ataques de patógenos (Thimm *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2005; Kokkinos e Clark, 2006; Cernadas *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008). Esta técnica foi utilizada para estudar respostas de plantas cítricas a diferentes estímulos como infecção por *Citrus tristeza virus* (Gandia *et al.*, 2007), infecção por *Phytophthora parasitica* (Boava *et al.*, 2011), tolerância à salinidade (Terol *et al.*, 2007), entre outros. Estudos recentes mostram que o microarranjo pode ser utilizado de maneira eficiente para investigar a interação entre vírus e seus hospedeiros (Whitham *et al.*, 2003; Golem e Culver, 2003; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão diferencial de genes por microarranjos de cDNA associados com a resposta à infecção pelo vírus da leprose dos citros e identificar genes diferencialmente expressos entre plantas resistentes e suscetíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A leprose dos citros

2.1.1. Histórico

A leprose dos citros foi relatada pela primeira vez na Flórida em 1911 e, inicialmente, acreditava-se que era causada por um fungo (Fawcett e Burger, 1911 *apud* Bitancourt, 1955). Em 1920, a leprose foi relatada na Argentina e dez anos depois, foi considerada a mesma doença descrita anteriormente na Flórida (Spegazzini, 1920). Além disso, existem relatos antigos de sintomas da doença na China, Índia, Ceilão, Japão, Filipinas, Java, Egito e África do Sul (Fawcett, 1936; Bitancourt, 1955; Choudhari e Mali, 1978), embora relatos mais recentes não comprovem esta informação. Em 1931, a leprose dos citros foi encontrada no Brasil (Bitancourt, 1934), mas somente em 1934 foi considerada a mesma doença encontrada anos antes na Flórida (Bitancourt, 1955).

A associação da leprose dos citros com os ácaros Tenuipalpídeos do gênero *Brevipalpus* só ocorreu em meados de 1940 (Frezzi, 1940; Vergani, 1945; Knorr, 1950, 1968; Mussumeci e Rossetti, 1963), sendo que inicialmente acreditava-se que os sintomas visualizados em plantas cítricas eram causados por uma toxina injetada pelos ácaros (Vergani, 1945).

A etiologia viral da leprose dos citros só foi demonstrada anos depois, pela visualização de partículas virais associadas às lesões por Kitajima *et al.* (1972), por expansão da lesão para novos tecidos por enxertia (Chagas e Rossetti, 1984) e, finalmente, por transmissão mecânica (Colariccio *et al.*, 1995).

A leprose afeta especialmente laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], com mais de 60% dos pomares paulistas apresentando plantas com sintomas da doença (Salva e Massari, 1995). No entanto, sintomas característicos podem ocorrer, em

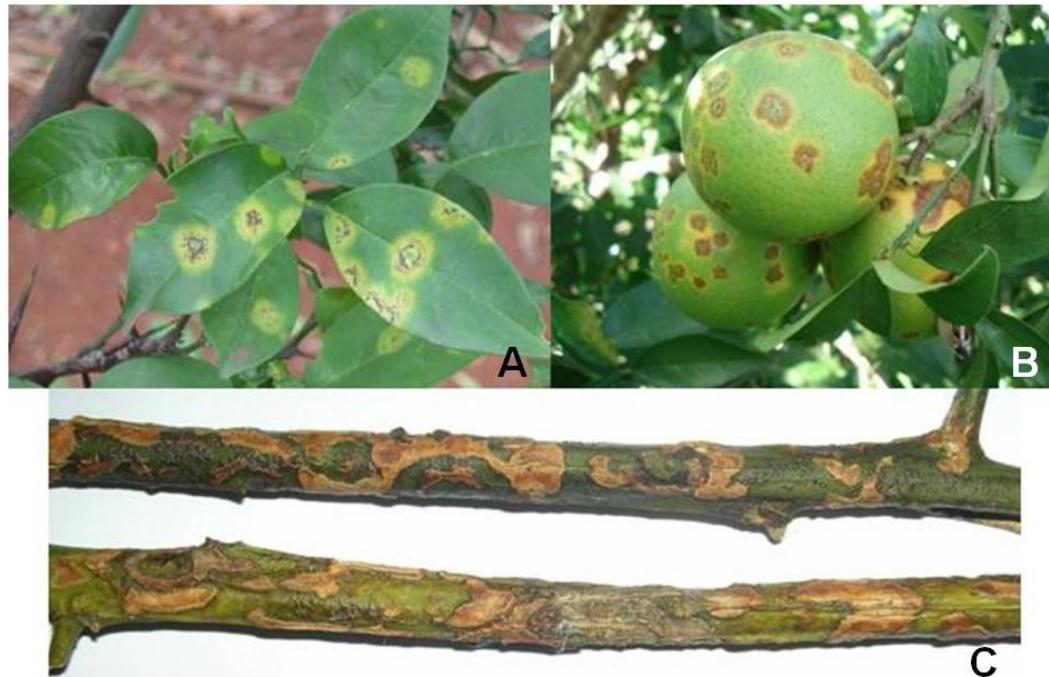
diferentes níveis, em praticamente todas as espécies e variedades de *Citrus* (Bitancourt, 1955; Roessing e Salibe, 1967; Trindade e Chiavegato, 1990). De uma maneira geral, limões, limas doces e tangerinas são considerados mais resistentes e/ou tolerantes à leprose, enquanto laranjas doces têm se mostrado altamente suscetíveis. Porém, a diferença de reação sintomatológica pode ser resultado não apenas do material genético, mas também da influência do local, da fase de desenvolvimento do órgão afetado (Vergani, 1945), da população de ácaros virulíferos e do isolado do vírus (Freitas-Astúa *et al.*, comunicação pessoal).

Alguns autores observaram que o tangor ‘Murcott’, um híbrido de laranja doce com tangerina, apesar de permitir a colonização do vetor, não desenvolve sintomas de leprose (Chiavegato *et al.*, 1982; Boaretto e Chiavegato, 1994; Rodrigues, 1995), possivelmente por ter herdado resistência e/ou tolerância das tangerineiras.

Bastianel *et al.* (2004) realizaram experimentos de campo e de casa de vegetação com o objetivo de avaliar a resposta de tangor ‘Murcott’ e híbridos de tangor ‘Murcott’ x laranja ‘Pêra’. A escolha do tangor ‘Murcott’ foi realizada por sua relativa importância comercial e sua inclusão em programas de melhoramento com objetivo de obter variedades resistentes a doenças como a leprose e a clorose variegada dos citros (Oliveira, 2003; Bastianel *et al.*, 2004). Com este experimento foi possível verificar que as plantas de laranja ‘Pêra’ em campo estavam altamente afetadas pela doença ou mortas, enquanto que as plantas de ‘Murcott’ não demonstravam sintomas, embora o vírus tenha sido detectado também nestas plantas por RT-PCR. Os híbridos de tangor ‘Murcott’ x laranja ‘Pêra’ apresentaram respostas variáveis. Contudo, ainda são necessários novos estudos com o intuito de se compreender melhor o patossistema e a resistência ou tolerância associados ao *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C).

2.1.2. Sintomas

Os sintomas da leprose, manifestados como lesões locais cloróticas ou necróticas, lisas ou salientes, aparecem cerca de 17 a 60 dias após a transmissão do vírus pelo ácaro nas folhas, frutos e ramos (Bassanezi *et al.*, 2002). As lesões são tipicamente circulares, mas podem apresentar morfologia alongada, especialmente quando ocorrem próximas às nervuras foliares (Figura 1).



Fonte: Bastianel *et al.*, 2010

Fig. 1 – Lesões típicas causadas pela leprose dos citros (CiLV-C). **A** - Em folhas, **B** – em frutos e **C** – em ramos.

A leprose dos citros pode ser causada por dois vírus diferentes, o *Citrus leprosis C* (CiLV-C) e o vírus do tipo nuclear da leprose dos citros (CiLV-N), ainda não muito estudado. O CiLV-C ocorre com frequência, enquanto o CiLV-N foi encontrado em poucos locais até o momento. As lesões causadas pelo CiLV-C são em geral maiores e mais amareladas do que as causadas pelo vírus da leprose do tipo nuclear, tendendo à formação de halos concêntricos de goma em torno das lesões (Bastianel *et al.*, 2010). O

número de lesões e a época de aparecimento dos sintomas podem causar intensa desfolha na planta e queda prematura de frutos. Lesões nos ramos podem levar ao escamamento da casca e seca, tornando-os improdutivos. Infestações altas de ácaros virulíferos podem levar à diminuição da vida útil, e até a morte de plantas altamente suscetíveis (Frezzi, 1940; Bitancourt, 1955; Bassanezi *et al.*, 2002).

2.1.3. Citopatologia

As partículas observadas por Kitajima *et al.* (1972) (Figura 2) apresentavam efeitos citopatológicos similares aos causados por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTB) do tipo nuclear (-N), como por exemplo o Orchid fleck virus (OFV) e o Coffee ringspot virus (CoRSV). Os VTB-N geralmente apresentam partículas do tipo baciliforme, medindo 100-110 nm de comprimento e 40-50 nm de largura. Essas partículas ocorrem comumente associadas perpendicularmente à membrana interna do envelope nuclear e podem ainda estar presentes no citoplasma, freqüentemente associadas às membranas do retículo endoplasmático, empurrando a membrana da mesma forma que no envelope nuclear. Frequentemente, as partículas virais formam arranjos de membranas dispostas em círculo, os vírions organizados radialmente, gerando configurações conhecidas como “roda de carroça” (Lesemann *et al.*, 1975). Em raras ocasiões, partículas virais isoladas e providas de membrana têm sido encontradas no lúmen do retículo endoplasmático, aparentemente tendo completado o processo de brotação (Kitajima *et al.*, 2003a). Por muitos anos, este foi o único relato destes efeitos associados à leprose dos citros.

Amostras analisadas posteriormente demonstravam efeitos citopáticos associados à VTBs do tipo citoplasmático (-C): partículas curtas, baciliformes e com membrana, apresentando largura de 60 a 70 nm e comprimento de 120 a 150 nm;

ocorrendo isoladas ou agrupadas, sempre no lúmen do retículo endoplasmático, e ocasionalmente podiam ser encontradas na cavidade perinuclear, possivelmente migrando do retículo endoplasmático. Diferentemente do tipo nuclear, o viroplasma dos vírus do tipo citoplasmático ocorreriam como inclusões citoplasmáticas elétrons densas e vacuoladas, de forma e dimensões variadas (Kitajima *et al.*, 2003a; 2003b) (Figura 3).

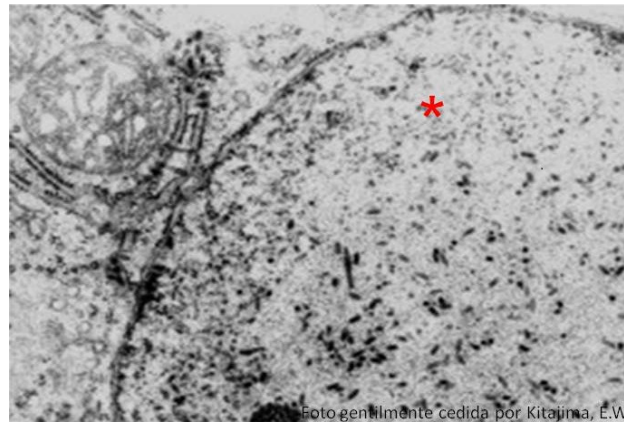


Fig. 2 – Microscopia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas de folhas de citros infectadas por CiLV-N. * Viroplasma elétron-transparente.

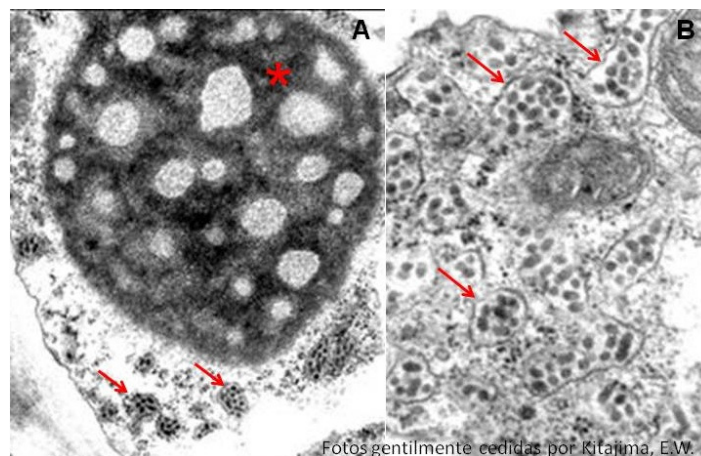


Fig. 3 – Microscopia eletrônica de transmissão de secções ultrafinas de folhas de citros infectadas por CiLV-C. * Viroplasma elétron-denso. As setas indicam grupos de partículas baciliformes agrupadas na cisterna do retículo endoplasmático.

Plantas infectadas com a leprose do tipo nuclear (Figura 4) foram encontradas em pomares não comerciais, apenas no ano de 2003, nos municípios de Amparo e Monte Alegre do Sul (Kitajima *et al.*, 2004). Desde então, as duas formas do vírus da leprose dos citros vêm sendo tratadas como vírus diferentes.



Fig. 4 – **A** - Planta cítrica com sintomas do CiLV-N em pomar não comercial. **B** – lesão causada por CiLV-N em folhas de citros.

2.1.4. Genomas dos VTB

Uma revisão sobre *Rhabdovirus* de plantas de Jackson *et al.* (2005) classificou VTBs como: CiLV-C, CoRSV e OFV tentativamente como membros da família *Rhabdoviridae*, baseado apenas na morfologia de suas partículas.

Entretanto, após o sequenciamento do vírus da leprose dos citros, Pascon *et al.* (2006) verificaram que a organização do genoma apresentava-se dividido em 2 RNAs, sendo que o primeiro possuía uma *ORF* com similaridade com replicases de *Furovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus* e *Pomovirus*, enquanto outra *ORF*, de 32,5 KDa do RNA2, demonstrou similaridade com proteínas de movimento de *Furovirus* e *Bromovirus*. Com

base na análise filogenética da possível replicase, estes autores concluíram que o CiLV-C seria um possível *Tobamo-like virus*.

Locali *et al.* (2006) completaram o sequenciamento do genoma do CiLV-C independentemente de Pascon *et al.* (2006), e após uma análise detalhada, levando em conta não apenas as sequências encontradas no trabalho, mas também o vetor, formato das partículas virais, sintomatologia e citopatologia. Os autores demonstraram que o genoma do CiLV-C é dividido em 2 RNAs, um com 5 KDa e o outro com 9 KDa (Figura 5), e a proteína de movimento putativa apresentou similaridade com *Furovirus*, *Bromovirus* e *Umbravirus*. Finalmente, levando em conta a falta de similaridade de sequências e a chave de classificação de *Rhabdovirus* do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) que inclui: composição bioquímica dos vírions (ssRNA de senso negativo), estratégia de replicação, estrutura das partículas e organização do genoma (monopartido), Locali *et al.* (2006) concluíram que o CiLV-C não poderia ser classificado nesta família e nem em outra família ou gênero existentes, por suas características únicas. Desta forma, foi proposta a criação de um novo gênero chamado *Cilevirus*, classificação recentemente aprovada pelo ICTV (Carstens, 2010).

Os vírus do tipo nuclear ainda são considerados *Rhabdovirus-like*. Kondo *et al.* (2006) propuseram que o Orchid fleck virus faria parte de um novo gênero dentro da família *Rhabdoviridae*, chamado de Dichorhabdovirus por apresentar seu genoma bipartido. Este novo gênero ainda não foi proposto ao ICTV, não podendo ainda ser considerada uma classificação oficial.

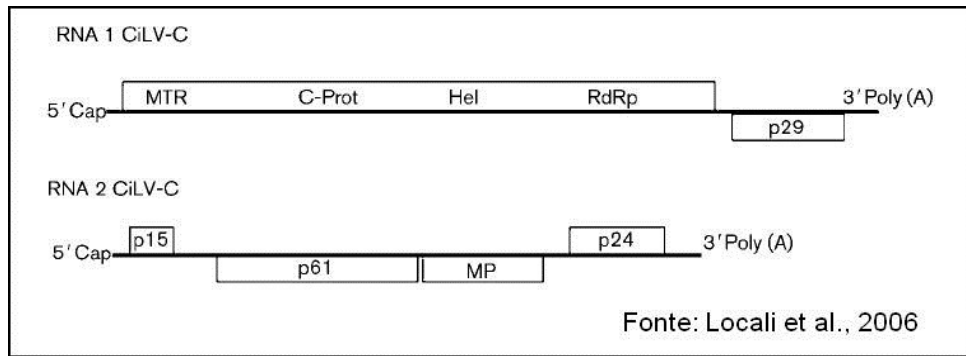


Fig. 5 – Organização genômica do CiLV-C proposta por Locali *et al.* (2006).

2.2. Mecanismos de resposta de defesa em plantas

Durante a infecção de uma planta por vírus, ocorrem diversas alterações fisiológicas no hospedeiro. Essas alterações podem ocorrer devido à utilização da maquinaria celular para produzir componentes virais ou favorecer a replicação viral, supressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou ainda, respostas celulares para compensar os efeitos das alterações causadas pelo vírus (Matthews, 1991).

A identificação de genes do hospedeiro que apresentam alterações induzidas por vírus pode fornecer ligações entre processos virais e celulares para o desenvolvimento de respostas de defesa. Genes diferencialmente regulados na presença de vírus podem demonstrar variações nos níveis de expressão, correspondendo ao avanço do patógeno no hospedeiro (Golem e Culver, 2003).

As doenças induzidas por vírus podem variar em relação à severidade, sendo que as respostas podem variar em tolerância, desde poucas alterações causadas na fisiologia do hospedeiro até respostas severas que podem levar o hospedeiro à morte (Golem e Culver, 2003). Vários estudos sobre interações entre vírus e hospedeiros foram realizados com foco nas diferenças entre infecções em hospedeiros suscetíveis e resistentes (Fregene *et al.*, 2004; Anaya-López *et al.*, 2005; Trinks *et al.*, 2005; Cernadas *et al.*, 2008).

Atualmente os estudos de transcriptoma da interação entre plantas e patógenos têm revelado alterações significativas na expressão de genes durante o processo de infecção e colonização. Estudos de padrões globais de expressão têm contribuído para identificação de genes envolvidos em diversas vias, incluindo as de respostas de defesa. Além disso, o entendimento genético destas vias tem sido fundamental não só para a compreensão dos mecanismos biológicos estudados como para o desenvolvimento de novas estratégias de manipulação genética (Bruno e Wetzel, 2004). Assim, a obtenção de bibliotecas de ESTs e a posterior construção de microarranjos de DNA tem sido uma das principais estratégias para o estudo de transcriptoma em várias espécies (Hu *et al.*, 2003; Andersson *et al.*, 2004; Casu *et al.*, 2004).

Diferentes plantas cítricas possuem diferentes graus de suscetibilidade à leprose dos citros. Não se sabe ainda quais os mecanismos de defesa envolvidos na resposta ao CiLV-C e, embora as lesões da doença em plantas suscetíveis assemelhem-se a respostas de hipersensibilidade, ainda não existem evidências de que esta hipótese seja verdadeira. Freitas-Astúa *et al.* (2007) buscaram genes associados à interação entre plantas suscetíveis e o CiLV-C através de bibliotecas de EST, e verificaram que possivelmente a interação entre estas plantas e o vírus seja do tipo compatível, ou seja, que resulta em doença. Apesar disso, informações sobre a expressão diferencial de genes em plantas resistentes e suscetíveis ao CiLV-C são ainda muito limitadas.

Levando-se em conta a biologia do CiLV-C e seu modo de transmissão, pode-se especular que a resposta das plantas à infecção por este patógeno englobe tanto respostas ao vírus quanto às injúrias causadas pela alimentação do ácaro vetor. Isso porque não é possível separar o vírus de seu vetor, uma vez que, na natureza, o patógeno é totalmente dependente do ácaro para a sua disseminação (Rodrigues *et al.*, 2003). Além disso, alguns estudos demonstram que a percepção de sinais e transdução

de vias de resposta à interação planta x herbívoros podem ser similares às de interação plantas x patógenos (Voelckel e Baldwin, 2004; Kaloshian e Walling, 2005; Wang *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2011). Desta forma, para a melhor compreensão do patossistema, faz-se necessária a revisão de vias clássicas de resposta de defesa contra patógenos e herbívoros.

2.2.1. Mecanismos de sinalização

Existem dois tipos de reconhecimentos moleculares de patógenos na imunidade inata. O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou microrganismos, chamados de PAMPs ou MAMPs (*pathogen/ microbe-associated molecular patterns*), que ocorre tipicamente nas membranas celulares e ativam a imunidade PTI (*pattern-triggered immunity*) (Boller e Felix, 2009), e o reconhecimento de efetores de patógenos (ETI – *effector-triggered immunity*), desempenhado por proteínas R, que ocorre dentro das células vegetais (Jones e Dangl, 2006). Existe uma teoria de que o reconhecimento de efetores por proteínas R é realizado pela percepção de uma modificação do hospedeiro pelo patógeno (Jones e Dangl, 2006). As proteínas de avirulência do patógeno, descritos por Flor (1947), são na realidade efetores citoplasmáticos necessários para a infecção de bactérias, fungos, nematóides, etc (Schneider e Collmer, 2010). Ainda, segundo os mesmos autores, as proteínas R são em geral codificadas por NB-LRRs, que contém domínios de ligação de nucleotídeos (NB – *nucleotide binding*) e repetições ricas em leucina (LRR – *leucin rich repeats*).

Os ataques de patógenos e contra-ataques das plantas foram intensamente revisados por Schneider e Collmer (2010). Ao entrar na planta, PAMPs ou MAMPs

dos patógenos, como por exemplo, flagelinas e peptidoglicanas, são reconhecidos pela planta através de receptores tipo quinase, ativando a imunidade por PAMPS.

A associação de patógenos virais com seus hospedeiros sugere que os genomas de vírus possam funcionar como PAMPS na indução de respostas de defesa (Wang *et al.*, 2009). Alguns estudos de transcriptoma de respostas de plantas a diferentes vírus demonstraram que cerca de um terço dos genes induzidos durante infecções suscetíveis são relacionados à defesa (Golem e Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003). Este fato demonstra que as plantas reconhecem e respondem a padrões moleculares virais.

Quando os patógenos superam as PTIs, como por exemplo em infecções sistêmicas virais (Wang *et al.*, 2009) as plantas reconhecem a atividade de um ou mais destes efetores dentro de suas células por meio de proteínas de resistência R. Na maioria dos casos, as proteínas R reconhecem a atividade do efector. A imunidade ativada por efetores (ETI) causa tipicamente a morte celular programada (PCD) e resistência qualitativa. Os patógenos podem superar os ETI por mutações em genes que codificam efetores que são reconhecidos pela planta, ou pela implementação de um efector que suprime a ETI elicitado por um ou mais efetores. A evasão do ETI por mutação estratégica tem sucesso, pois repertórios de efetores citoplasmáticos (proteínas translocadas para dentro da célula da planta por patógenos) são altamente redundantes e cada efector é individualmente dispensável. Por outro lado, as plantas podem evoluir e/ou adquirir por recombinação novos genes R, que reconhecem a atividade de um efector que suprime o ETI ou qualquer outro efector potencialmente prevalente na população do patógeno.

As plantas em geral respondem a patógenos pela via do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), sendo que os vírus de RNA ativam tipicamente a

via do SA (Whitnam *et al.*, 2003). Entretanto, não existem ainda informações equivalentes disponíveis para os vírus transmitidos por *Brevipalpus*.

2.2.1.1. Assinaturas de cálcio

Diversos MAMPs parecem disparar respostas similares precoces via diferentes PRRs incluindo o acúmulo de Ca^{2+} (Vadassery e Oelmüller, 2009). A amplitude, frequência, duração e localização do acúmulo de Ca^{2+} na célula, podem desencadear respostas fisiológicas específicas, incluindo as de defesa pela via das MAP quinases (Vadassery e Oelmüller, 2009; Boudsocq *et al.*, 2010). Os níveis de Ca^{2+} celular são finamente regulados, e mesmo uma pequena variação na sua concentração fornece informações para a ativação e sinalização de proteínas.

O estudo do Ca^{2+} nas células e a observação de que diferentes estímulos causam alterações únicas no seu acúmulo, levaram a um novo objeto de estudo, chamado de assinaturas de cálcio. Esse mecanismo é altamente complexo e envolve um todo um repertório de sinais produzidos por sensores de cálcio, proteínas efetoras e genes que transduzem os sinais para possibilitar uma resposta sinal-específica (Reddy e Reddy, 2004). Cada sensor como a calmodulina (*CaM*), *calcinerin B-like proteins (CBL)* e *Calcium-dependent protein kinases (CDPK)* tem multiplicidade de papéis, podendo responder a diversos sinais simultaneamente (Li *et al.*, 2009).

Atualmente, vários processos que envolvem a sinalização por Ca^{2+} são conhecidos como: estresse oxidativo, resposta de hipersensibilidade, resposta contra doenças, resposta a frio ou calor, entre outras.

2.2.2. Ácido salicílico

O ácido salicílico (SA) é essencial na resposta de defesa a patógenos biotróficos (Grant e Lamb, 2006). Níveis aumentados deste hormônio podem ser detectados em plantas após a infecção por patógenos, e sua aplicação exógena resulta em um aumento na resistência (Bari e Jones, 2009).

A sinalização por SA pode ser iniciada com a expressão de genes NB-LRR, que são divididos com base em um domínio N-terminal *coiled-coil* (CC) ou *Toll and human interleukin receptor* (TIR - Meyers *et al.*, 2003). É a presença dos domínios TIR ou CC que determina se a resposta de resistência mediada por NB-LRR requererá NDR1 (*Non-race-specific Disease Resistance*) ou o complexo EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*)/PAD4 (*Phytoalexin Deficient 4*)/SAG101 (*Senescence Associated Gene 101*) (Feys *et al.*, 2005; Day *et al.*, 2006).

A sinalização a jusante de SA é regulada pela NPR1, que contém um motivo *ankyrin-repeat* e um domínio BTB/POZ (*broad-complex, tramtrack, and bric-a-brac/poxvirus, zinc finger*) e codifica um fator de transcrição putativo (Cao *et al.*, 1997).

Os fatores de transcrição possivelmente ligados diretamente à regulação de expressão de genes PR ao final da via do SA são os TGA e os WRKY. O TGA faz parte da família dos fatores de transcrição TGA/OBF, que reconhecem elementos TGACG/as-1/ocs em vários genes de plantas e fitopatógenos (Bari e Jones, 2009), incluindo aqueles que regulam a expressão de PR-1 em tabaco (Katagiri *et al.*, 1989), glutationa S-transferase de *Arabidopsis* e soja (Ulmasov *et al.*, 1995). As proteínas da família WRKY estão envolvidas na alteração de expressão de genes relacionados às respostas contra vírus, outros patógenos e elicitores (Espinoza *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2002; Chen e Chen, 2002). Esta família possui em comum o domínio WRKY, uma

região altamente conservada de cerca de 60 aminoácidos contendo um *zinc finger* na região C-terminal e a sequência WRKYGQK altamente conservada na sua região N-terminal (Pandey e Somssich, 2009). Esta região é necessária para o dobramento apropriado do *zinc finger*, sendo então, co-responsável pela ligação do DNA (Maeo *et al.*, 2001). O domínio WRKY geralmente liga-se a sequências de DNA chamadas de W-box, que contém uma sequência TGAC (Wang *et al.*, 1998; Turk *et al.*, 2004; Pandey e Somssich, 2009), embora sítios de ligação alternativos tenham sido descritos (Ciolkowski *et al.*, 2008; van Verk *et al.*, 2008). Os *W-boxes* foram identificados em promotores de vários genes relacionados à defesa, incluindo genes PR e dentro dos próprios promotores WRKY, sugerindo então que os fatores de transcrição WRKY podem regular sua própria expressão (Eulgem *et al.*, 1999). Mais recentemente, foram identificados genes alvos putativos dos WRKY que codificam *receptor-like kinases* e uma NPR1 (Yu *et al.*, 2001 *apud* Pandey e Somssich, 2009, p.1649).

As proteínas PR são polipeptídeos de baixo peso molecular (de 10 a 40 kDa), altamente resistentes às proteases, que em geral possuem pontos isoelétricos extremos e parecem ser excretadas no fluído intercelular (Van Loon, 1985). Desde sua descoberta, em 1970, 17 famílias foram identificadas com base em sequências de aminoácidos, relações serológicas e/ou atividade enzimática e biológica (Van Loon *et al.*, 2006). As proteínas PR são fatores de defesa relacionados a vírus, viróides, fungos e bactérias (Van Loon, 1985; White e Antoniw, 1987; Bol *et al.*, 1990; Linthorst, 1991) sintetizadas por plantas em resposta a infecção por patógenos (Van Loon e Van Strien, 1999). Algumas isoformas da PR-1 são secretadas em folhas de *Nicotiana tabacum* em resposta ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Dixon *et al.*, 1991; Buchel e Linthorst, 1999). O acúmulo destas proteínas no espaço extracelular é uma das principais alterações quantitativas em tecidos vegetais distais não infectados, que podem

desenvolver a resistência sistêmica adquirida (SAR) contra patógenos após o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (HR) (Ross, 1961 e Kuc, 1982 *apud* Rivière *et al.*, 2008, p.1225).

As PR-2 são β -1,3-glucanases, capazes de catalisar a clivagem de ligações 1,3- β -D-glucosídicas em β -1,3-glucanas. Além da sua função na resposta de defesa de plantas a patógenos, existem evidências de que elas estão envolvidas em diversos outros processos fisiológicos e de desenvolvimento, como fertilização (Lotan *et al.*, 1989) e embriogênese (Dong e Dunstan, 1997). Existem evidências de que as glucanoidrolases agem de pelo menos duas formas diferentes, pela degradação da parede celular do patógeno ou pela promoção da liberação de material derivado de paredes celulares que podem agir como elicitores de reações de defesa (Bowles, 1990).

Alguns estudos demonstraram que o SA é necessário para a ativação rápida de diversos genes associados à resistência, que podem resultar na indução localizada de defesa, e restringem a infecção de patógenos virulentos através de resposta de HR e do estabelecimento da SAR (Kunkel e Brooks, 2002).

Em uma revisão sobre o centenário da hipersensibilidade, Mur *et al.* (2008) definiram a reação de hipersensibilidade como resistência do hospedeiro por causar uma morte rápida das células em que ocorreu a infecção, de forma a isolar o patógeno e impedir que este colonize a planta. Ainda segundo os mesmos autores, esta forma de morte celular deve ocorrer por disfunções metabólicas nas quais o mau funcionamento das organelas deve ter papel chave. A lesão de hipersensibilidade pode ter suas características macro e microscópicas variadas de acordo com o patógeno, o tempo de infecção e o hospedeiro, mas uma das formas de diferenciar estas lesões das causadas por sintomas ou sinais de doenças é a distinção clara e abrupta das células mortas e das

células vivas que as circundam (Christopher-Kozjan e Heath, 2003; Krzymowska *et al.*, 2007). Algumas comparações citológicas demonstraram semelhanças entre a HR e a apoptose (uma das formas principais de morte celular em animais). O encolhimento do protoplasto que ocorre na HR (Heath, 2000) lembra o colapso citoplasmático que ocorre durante a apoptose (Mur *et al.*, 2008); o rearranjo do citoesqueleto ocorre nas duas formas de morte celular (Mur *et al.*, 2008) e o rápido cessamento da mobilidade do citoplasma (Naton *et al.*, 1996) em animais foi considerada semelhante à despolimerização do citoesqueleto na HR (Shimmen e Yokota, 2004). Deve-se atentar, no entanto, ao fato de que na apoptose o destino dos restos de protoplastos são os corpos apoptóticos, fato relacionado à existência de paredes celulares em vegetais (Mur *et al.*, 2008).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é uma resposta imune secundária que ocorre em regiões distantes das ativadas por respostas locais de defesa (Zhang *et al.*, 2010), causando estado de resistência duradouro e efetivo contra uma vasta gama de patógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Durrant e Dong, 2004). Em geral, a SAR é induzida por patógenos que apresentam interação incompatível com seus hospedeiros e causam morte celular localizada. A SAR é associada com a ativação de um grande número de genes PR, sendo considerada como resultado da ação de produtos codificados por estes genes (Ward *et al.*, 1991; Maleck *et al.*, 2000).

O sinal para a ativação sistêmica do SAR é gerado na folha inoculada e é transmitido via floema para partes não infectadas da planta (Klessig e Malamy, 1994; Vlot *et al.*, 2008). Inicialmente acreditava-se que o SA seria este sinalizador, uma vez que os níveis de SA aumentavam coincidentemente com, ou imediatamente antes do desenvolvimento do SAR (Rasmussen *et al.*, 1991; Mölders *et al.*, 1996; Zhang *et al.*,

2010). Além disso, estudos com traços radioativos sugeriram que existe uma quantidade significativa de SA em folhas de pepino e tabaco distantes das infectadas com patógenos (Shulaev *et al.* 1995; Mölders *et al.*, 1996). Entretanto, estudos com folhas destacadas sugeriram que o sinal móvel de SAR move-se para fora da folha infectada antes que níveis aumentados de SA fossem detectados em exsudato do pecíolo daquela folha (Rasmussen *et al.*, 1991). Há ainda trabalhos de Shirasu *et al.* (1997) e Draper (1997), nos quais foi demonstrado que para a ativação do SAR são necessários *bursts* primários e secundários. Esses autores então propuseram que *microbursts* de espécies reativas de oxigênio (ROS) poderiam ativar as respostas em nível baixo de defesa pela planta, contribuindo com o estado de resistência ocasionado por SAR (Durrant e Dong, 2004).

2.2.3. Etileno/jasmonato

As plantas respondem a compostos específicos que indicam a presença de herbívoros. Estes compostos foram classificados como padrões moleculares associados à herbivoria (HAMPS; Felton and Tumlinson, 2008; Mithöfer and Boland, 2008; Schafer *et al.*, 2011).

Sabe-se que existem diferenças na sensibilidade de plantas aos HAMPS, fato consistente com a possibilidade dos mecanismos de reconhecimento serem específicos (Schmelz *et al.*, 2009). Uma das respostas conhecidas à herbivoria é a rápida ativação da via do ácido jasmônico (JA) pelo reconhecimento da injúria causada pela alimentação (Howe, 2004) ou pela detecção de HAMPS (Schmelz *et al.*, 2009; Wu e Baldwin, 2010)

O JA é um hormônio derivado do ácido linolênico (Thomma *et al.*, 2001; Beckers e Spoel, 2006), e tem sido amplamente relacionado a respostas de defesa contra ferimentos, ataques de insetos (Reymond *et al.*, 2000; Kazan e Manners, 2008) e organismos necrotróficos (Bari e Jones, 2009) em plantas. O etileno (ET) e o JA parecem ter suas vias relacionadas (Laudert e Weiler, 1998; Bari e Jones, 2009) e co-regulam os genes PR-3 e PR-4 em *A. thaliana*, que codificam respectivamente para chitinase de classe III e *havein-like protein* (Ryals *et al.*, 1996), ambas com atividade anti-microbiana (Penninx *et al.*, 1998 e Thomma *et al.*, 1999). Além de estar envolvido em respostas de plantas a doenças, o JA está envolvido em vários processos de desenvolvimento como: maturação de pólen, desenvolvimento de flores e frutos, regulação de reservas, fotossíntese, senescência e crescimento de raízes (Creelman e Mulpuri, 2002; Turner *et al.*, 2002; Kazan e Manners, 2008).

O papel do etileno nas respostas de defesa é controverso (Kunkel e Brooks, 2002). Em algumas interações este hormônio contribui para a resistência (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 1999), enquanto em outras ele está envolvido com o aparecimento de sintomas associados a doenças (Lund *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1999). Tanto a via de sinalização do etileno quanto a do jasmonato são necessárias para a ativação da resistência sistêmica induzida (ISR), uma forma de resistência sistêmica ativada pela bactéria colonizadora de raiz *Pseudomonas fluorescens* (Pieterse e van Loon, 1999).

Em geral, as vias do jasmonato e do etileno são associadas aos patógenos necrotróficos (Bari e Jones, 2009). Além disso, as concentrações de jasmonato aumentam em locais afetados por patógenos ou por danos mecânicos da mesma forma que a expressão de genes relacionados à defesa é induzida pela aplicação de JA exógeno (Lorenzo e Solano, 2005).

Uma síntese da via do ácido jasmônico foi realizada por Kazan e Manners (2008). O ácido α -linolênico é liberado pelos fosfolipídeos de membrana pela ação da fosfolipase A, sendo então convertido em 12-OPDA nos cloroplastos por uma série de reações catalizadas pela *13-lipoxygenase* (LOX), *allene oxide synthase* (AOS), e *allene oxide cyclase* (AOC), respectivamente. O 12-OPDA gerado é transportado para os peroxissomos, onde é primeiramente reduzido, passando por três ciclos de β -oxidação para produzir o ácido jasmônico. O ácido jasmônico é então modificado no citossol para produzir diversos derivados. Os três componentes principais da sinalização por JA incluem: (1) *coronatine insensitive 1* (COI1), que codifica uma proteína *F-box* envolvida na degradação de proteínas mediadas por SCF pelo proteossoma 26S e necessário para a maioria das respostas mediadas por JA (Xie *et al.*, 1998); (2) o *jasmonate resistant 1* (JAR), que codifica uma aminoácido sintetase de JA, e está envolvido na conjugação de isoleucina a JA (JA-Ile), considerada uma molécula bioativa de JA percebida pelas plantas (Staswick e Tiryaki, 2004; Thines *et al.*, 2007); e, (3) o *Jasmonate insensitive 1/MYC2* (JIN1/MYC2), fator de transcrição envolvido na regulação transcricional da expressão de alguns genes que respondem a JA (Lorenzo *et al.*, 2004).

A via do etileno é iniciada pelo ciclo da metionina, no qual o etileno é sintetizado a partir do *S-adenosyl-methionine* (SAM) pelo *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid* (ACC) (Buchanan, 2000). A jusante do etileno no genoma, existem os fatores de transcrição *EIN2* e *EIN3*, *ethylene insensitive 2* e 3, respectivamente. Mutações de perda de função em *EIN2* causam completa insensibilidade da planta ao etileno; mutantes com perda de função de *EIN3* demonstram ausência de efeitos mediados pelo etileno (Chao *et al.*, 1997). Interessantemente, a superexpressão do *EIN3* resulta em respostas tanto no tipo selvagem da planta quanto em mutantes *EIN2*,

demonstrando que o *EIN3* é tanto necessário quanto suficiente para a ativação da via do etileno (Chao *et al.*, 1997). O fator de transcrição *ORA59* é membro da família *ERF* e integra a comunicação entre as vias do etileno e do jasmonato, regulando a expressão de genes de resposta de defesa como o *plant defensin1.2 (PDF 1.2)* e *basic chitinase (ChiB)* (Pré *et al.*, 2008).

2.2.4. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas como subprodutos do metabolismo aeróbico (Halliwell, 2006). Tanto a produção de ROS quanto a proteção contra elas são características intrínsecas de qualquer célula viva (Bolwell e Wojtaszek, 1997). O oxigênio em seu estado fundamental é inerte, mas pode ser convertido a ROS, ou pela transferência de elétrons formando o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot), ou por transferência de energia que leva à formação de oxigênio (O_2 - Foote, 1968; Gollnick, 1968 *apud* Kim *et al.*, 2008, p.1). Essas moléculas reativas, principalmente o OH^\cdot , são altamente prejudiciais aos lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (Buchanan, 2000). Entretanto, outros ROS como O_2^- e H_2O_2 são necessários como sinalizadores na resposta de defesa a patógenos (Buchanan, 2000).

Em plantas, geralmente o ROS é produzido nos cloroplastos e nos peroxissomos (Foyer e Noctor, 2003; Asada, 2006). O aumento do estresse oxidativo é produto dos eventos mais precoces da interação planta-patógeno (Bolwell e Wojtaszek, 1997). Níveis de ROS elevados, causados tanto pelo aumento de sua produção quanto pela diminuição na eficiência de eliminação podem contribuir com a resistência a patógenos nas reações incompatíveis (Adams *et al.*, 1989; Alvarez *et al.*, 1998, *apud* Hernandez *et al.*, 2006, p.141). Por outro lado, níveis elevados de ROS poderiam também contribuir

com o desenvolvimento de sintomas em interações compatíveis como em pessegueiros suscetíveis ao *Plum pox virus* (PPV) (Hernandez *et al.*, 2003), e em plantas de *Cucumis sativus* infectadas com *Cucumber mosaic virus* (CMV), e *Cucurbita pepo* infectadas com *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Riedle-Bauer, 2000).

As plantas, assim como outros organismos, possuem mecanismos eficientes de eliminação de ROS que incluem antioxidantes não-enzimáticos (carotenóides, ascorbato, glutatona e tocoferóis); enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPX), peroxidases; e enzimas do ciclo ascorbato-glutatona, ascorbato peroxidases (APX), desidroascorbato redutase (DHAR), monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e glutatona redutase (GR) (Hernandez *et al.*, 2006). Os componentes do sistema de defesa antioxidante podem ser encontrados em diferentes organelas celulares (Hernandez *et al.*, 2000) e são constitutivamente expressos para eliminar o ROS gerado em condições normais (Hernandez *et al.*, 2006). Existem alguns trabalhos que sugerem a importância da glutatona e outras enzimas relacionadas a respostas bioquímicas e fisiológicas ao estresse biótico (Fodor *et al.*, 1997; Gullner *et al.*, 1999). O trabalho de Escaler *et al.* (2000) demonstrou um padrão de expressão nos níveis de uma glutatona redutase citoplasmática similar à *HSP70* em ervilhas infectadas com vírus. Com base nestes resultados, Maule *et al.* (2002) sugeriram que a geração da glutatona (um antioxidante) e a ativação da catalase (para a remoção da H₂O₂) representam proteção aos vírus contra defesas do hospedeiro em interações compatíveis.

A elevação artificial da glutatona celular e a ativação de enzimas relacionadas à glutatona podem suprimir sintomas necróticos e, em alguns casos, até mesmo a multiplicação de vírus (Gullner *et al.*, 1999). Plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas com SA e JA demonstraram atividade elevada de catalase, GR e peroxidase (Clarke *et al.*,

2002); estes tratamentos, quando aplicados antes da inoculação do Potexvirus *White clover mosaic virus*, inibiram tanto a replicação viral quanto o desenvolvimento de sintomas.

2.2.5. Silenciamento gênico

O silenciamento de RNAs é um fenômeno geral em eucariotos e tem papel importante em vários processos biológicos como regulação de desenvolvimento, defesa antiviral e remodelamento de cromatina. As principais características do silenciamento de RNA incluem a produção de pequenos RNAs (entre 21 e 25 nt) pela *Dicer* (Bernstein *et al.*, 2001) e a formação de um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISCs) contendo um argonauta (*AGO*), que realiza o silenciamento diretamente no nível pós-transcricional (Hammond *et al.*, 2000, 2001; Verdel *et al.*, 2004). Os RNAs interferentes (RNAi) constituem um mecanismo de silenciamento evolutivamente conservado que silenciam sequências específicas de transcritos guiados por RNAs de fita-dupla (Meister e Tuschl 2004). A endonuclease não-específica *Dicer* cliva RNAs de dupla-fita (dsRNA) exógenos em RNAs interferentes curtos (siRNA). Estes siRNAs são subsequentemente incorporados no complexo RISC, onde eles guiam a clivagem de regiões perfeitamente complementares no RNA citoplasmático (*Slicer activity*) mediado pelo reconhecimento pelo *AGO* (Liu *et al.*, 2004). Os *AGO* utilizam os pequenos RNAs para guiá-los em direção de moléculas homólogas de RNA para então agir como endonuclease, repressor transcricional de mRNAs e na metilação de DNA (Voinnet, 2009). Em animais, uma vez gerados por *Dicers*, os siRNAs são carregados em RISCs contendo *AGO* para clivar seu mRNA alvo. Em mamíferos, foi demonstrado que o *AGO2* é o mecanismo catalítico (*slicer*) do RISC, diretamente responsável pela clivagem do mRNA (Song *et al.*, 2004; Lingel *et al.*, 2003). Plantas superiores

codificam 10 ou mais *AGO* (Scholthof *et al.*, 2011) e o papel da *AGO1*, *AGO2* e *AGO7* na defesa contra vírus já foi descrita para *Arabidopsis* (Qu *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011; Jaubert *et al.*, 2011).

A caracterização do complexo RISC foi iniciada em *Drosophila* com a identificação da proteína *AGO2*, (Hammond *et al.*, 2001). Estudos subsequentes demonstraram que proteínas Argonauta também são componentes do RISC em mamíferos, fungos, nematóides, protozoários e plantas (Carmell e Hannon, 2004; Martinez *et al.*, 2002).

2.3. Microarranjos como ferramenta de estudo de interação planta patógeno

A tecnologia de microarranjos de DNA permite a análise de expressão gênica em larga escala de genes com sequências previamente obtidas por sequenciamento. Estas podem ter origem em projetos de sequenciamento de genomas completos, ou mesmo parciais, como a obtenção de banco de ESTs, possibilitando a melhor compreensão de possíveis funções destes genes, e ainda, em que situações são mais expressos ou reprimidos.

No final da década de 90, os autores Brown e Borstein (1999) publicaram um excelente trabalho com as perspectivas que a nova tecnologia do microarranjo de DNA traria. A técnica original consistia na deposição de milhares de sequências conhecidas de DNA/cDNA, sondas, impressas por um robô, em posições conhecidas de um arranjo/matriz, em uma superfície sólida, geralmente uma lâmina de vidro. Para comparar a abundância relativa dos genes impressos entre duas amostras de cDNA, as duas amostras eram marcadas utilizando diferentes fluorescências (por exemplo, fluorocromos de cianina vermelha, Cy5, e verde, Cy3). As amostras marcadas eram

então misturadas e hibridizadas contra as sondas impressas. Após a hibridização e lavagem das amostras suspensas, era realizada uma leitura das intensidades de fluorescências emitidas pelos fluorocromos das amostras hibridizadas, proporcional ao nível de expressão gênica, e, a partir dessas intensidades, a geração de dados de abundância relativa de expressão entre as amostras.

Hoje, há três plataformas comerciais dominantes: Affymetrix e NimbleGen, ambas baseadas na fotolitografia das sondas, e a Agilent, baseada na deposição de microgotículas sobre a superfície sólida. A produção de microarranjo fotolitográfico envolve a desproteção altamente precisa de moléculas aceptoras bloqueadas por UV em substrato. Os nucleotídeos são covalentemente ligados a estas locações desbloqueadas, e o processo é reiterado, resultando na extensão de moléculas de DNA de fita simples em elementos acima de *pixel* quadrado na superfície. A diferença entre as plataformas Affymetrix e NimbleGen é a mecânica ótica da desproteção baseada em UV. A Affymetrix emprega uma série de máscaras (Lipshutz *et al.*, 1999), enquanto a NimbleGen emprega micro espelhos programáveis (Singh-Gasson *et al.*, 1999). A utilização dos micro espelhos aumenta a flexibilidade no desenho dos microarranjos, enquanto as telas litográficas possibilitam eficiência na produção de microarranjos pré-definidos. Por outro lado, os microarranjos da Agilent envolvem deposição sequencial de micro-gotículas, tecnologia de *ink-jet*, contendo nucleotídeos monômeros ativados em locais específicos do arranjo, que são então covalentemente incorporados em fitas estendidas de DNA de fita simples (Hughes *et al.*, 2001).

Os microarranjos tornaram-se ferramenta interessante para testar/gerar hipóteses, permitindo o acúmulo de grande quantidade de informação oriunda de uma análise global do genoma funcional de diferentes amostras (Schena *et al.*, 1998). Com base no trabalho de Schena *et al.* (1995), Whitham *et al.* (2003) afirmam que os microarranjos

de cDNA são uma excelente ferramenta para estudar efeitos globais da infecção viral na expressão de genes do hospedeiro.

A abordagem de utilizar dados prévios provenientes de bibliotecas de ESTs na arquitetura de lâminas de microarranjo tem sido amplamente utilizada, principalmente com organismos de genomas relativamente grandes ainda não completamente sequenciados. Estudos de expressão diferencial utilizando microarranjos de cDNA foram realizados com *Cercospora arachidicola* em amendoim (Luo *et al.*, 2005), em arroz com *Rice dwarf virus* (RDV – Shimizu *et al.*, 2007), para estudar expressão de um regulador de antocianina *MYB-type* em *Gerbera hybrida* (Laitinen *et al.*, 2008), para avaliar a expressão de limão tahiti (*C. aurantifolia*) em resposta ao CTV (Gandia *et al.*, 2007), resposta de laranja doce (*C. sinensis*) infectado com ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Kim *et al.*, 2009), entre outros.

O banco de dados de sequências provenientes de 33 bibliotecas de EST de citros (CitEST), construído a partir de diferentes gêneros de citros em resposta à diferentes estresses bióticos e abióticos, além de diversos estágios de desenvolvimento, deu origem a um vasto banco de dados (<http://limonia.centrodecitricultura.br/unipaper/features/>) utilizado na montagem das lâminas de microarranjo utilizados neste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Investigar o perfil de expressão gênica global da resposta de plantas cítricas resistentes e suscetíveis à leprose na presença do *Citrus leprosis virus C* e seu ácaro vetor.

3.2. Específicos

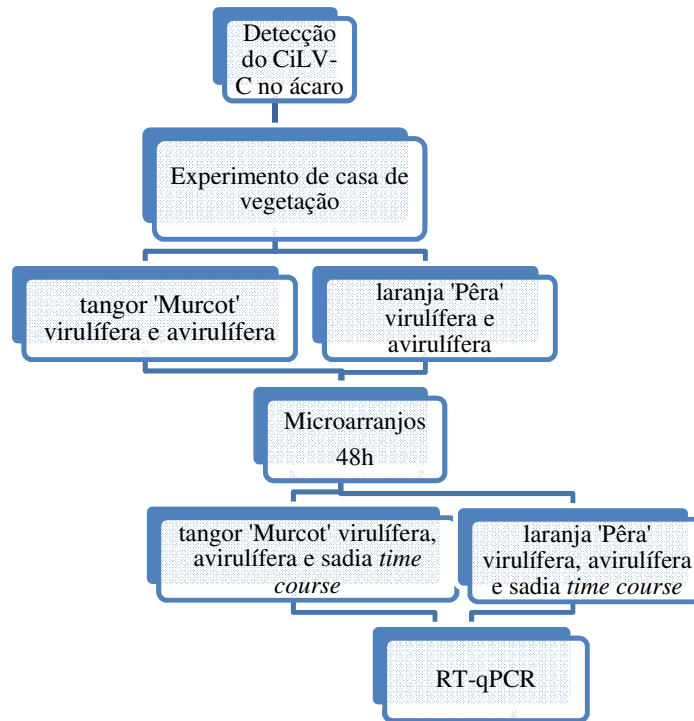
- Otimizar a eficiência de experimentos biológicos envolvendo o vetor do CiLV-C, pela certificação da aquisição do vírus pelos ácaros *Brevipalpus phoenicis* por RT-PCR;

- Avaliar a resposta diferencial de laranja ‘Pera’ (genótipo suscetível) e tangor ‘Murcott’ (genótipo resistente) ao CiLV-C por microarranjos, utilizando para montagem da lâmina a base de dados de bibliotecas de EST do CitEST;

- Validar por RT-qPCR a expressão de um grupo de genes selecionados nos resultados de microarranjo;

- Avaliar o perfil de expressão de alguns genes de resposta de defesa em laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ em experimento de *time course* com sete pontos de coleta (1h, 6h, 12h, 24h e 48h e 1 semana pós infestação com ácaros com e sem o vírus e após aparecimento de sintomas no genótipo suscetível) por RT-qPCR.

4. ORGANOGRAMA DE PLANEJAMENTO DOS EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS



Organograma - Experimentos biológicos instalados para avaliação de transcritos pelas técnicas de microarranjo e RT-qPCR. O primeiro experimento de casa de vegetação foi composto de três plantas de laranja 'Pera' e tanger 'Murcott' infestadas com ácaros virulíferos e outras três plantas de cada genótipo infestadas com ácaros avirulíferos, sendo a coleta de folhas realizada 48h após a infestação para avaliação de transcritos por microarranjos de cDNA. O segundo experimento consistiu em quatro plantas de laranja 'Pera' e tanger 'Murcott' infestadas com ácaros virulíferos e outras quatro plantas de cada genótipo infestadas com ácaros avirulíferos para cada tempo do time course de 1h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 1 semana e após o aparecimento de sintomas em plantas suscetíveis para a validação de genes selecionados a partir do experimento de microarranjo por RT-qPCR.

Capítulo 1

Artigo publicado

Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Bastianel, M.; Antonioli-Luizon, R.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. (2011). Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. *Exp. Appl. Acarol.*, 54:33–39.

5. DETECÇÃO DE VÍRUS TRANSMITIDOS POR BREVIPALPUS EM SEUS ÁCAROS VETORES

5.1. Resumo

O diagnóstico de doenças causadas por vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) era anteriormente realizada por análise de sintomas, microscopia eletrônica de transmissão e RT-PCR de tecidos vegetais infectados. Neste trabalho, nós relatamos a detecção do *Citrus leprosis virus C*, Orchid fleck virus, *Clerodendrum chlorotic spot virus* e *Solanum violaeifolium* ringspot virus em seus ácaros vetores utilizando primers específicos para cada um dos vírus. A eficiência de transmissão de VTBs é em geral baixa, portanto, a detecção destes patógenos em seus ácaros pode constituir uma ferramenta importante para estudos envolvendo relação vírus-vetor, transmissão e monitoramento do patógeno antes do aparecimento de sintomas no campo.

Palavras-chave: leprose, detecção de vírus, RT-PCR, citros, VTB, Tenuipalpidae.

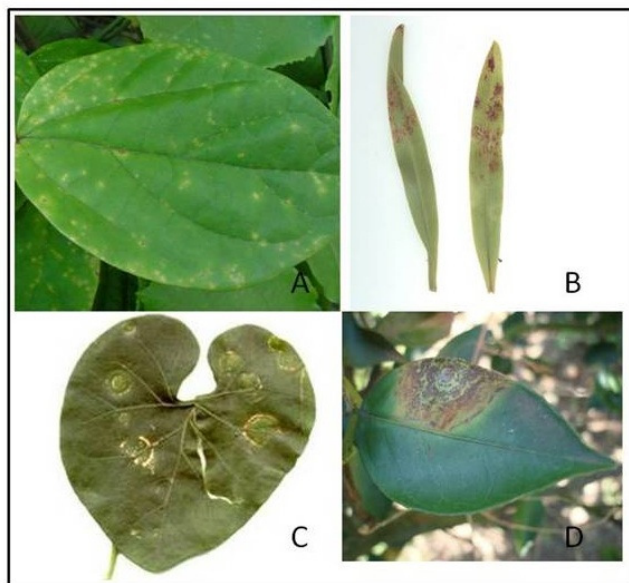
5.2. Abstract

The diagnosis of plant diseases caused by *Brevipalpus*-transmitted viruses (BrTVs) has been done through the analyses of symptoms, transmission electron microscopy, and RT-PCR of infected plant tissues. Here, we report the detection of *Citrus leprosis virus C*, Orchid fleck virus, *Clerodendrum* chlorotic spot virus and *Solanum violaeifolium* ringspot virus in their viruliferous vectors *Brevipalpus* spp. using specific primer pairs for each of the viruses. The efficiency of virus transmission by *Brevipalpus* mites is low, so the detection of these pathogens in their vectors could constitute an important tool for studies involving virus-vector relationships, transmission, and monitoring the pathogen prior to the appearance of symptoms in the field.

keywords: leprosis, virus detection, RT-PCR, citrus, BrTV, Tenuipalpidae

5.3. Introdução

Os vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) são atípicos, induzindo lesões localizadas cloróticas ou necróticas em folhas, ramos e frutos de seus hospedeiros (Figura 1). Ainda que estes vírus geralmente permaneçam confinados nestas lesões, sob condições de altas temperaturas alguns VTBs como o Coffee ringspot virus (CoRSV), *Clerodendrum* chlorotic spot virus (CICSV) e orchid fleck virus (OFV) podem movimentar-se sistemicamente em seus hospedeiros (Boari *et al.*, 2004; Kitajima *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2003).



Fonte: Kubo *et al.*, 2011

Fig. 1 – Lesões locais causadas por VTBs. **A** – *Clerodendrum x speciosum* infectado por CICSV. **B** – *Miltonia* sp. Infectada com OFV. **C** – *Solanum violaeifolium* infectada com SvRSV. **D** – Citrus infectado com CILV-C.

Estes vírus vegetais eram considerados membros putativos da família *Rhabdoviridae* por causa de suas partículas curtas, em formato de balas ou baciliformes, e de suas habilidades em se acumular, causando efeitos citopáticos no citoplasma ou no

núcleo de células infectadas. Dependendo de seu local de acúmulo, eles são chamados de VTBr do tipo nuclear (-N) ou do tipo citoplasmático (-C - Kitajima *et al.* 2003).

O sequenciamento completo do genoma do OFV revelou que ele possui similaridades com os *Rhabdovirus*, mas algumas características únicas, como seu RNA bipartido, levaram Kondo *et al.* (2006) a propor que o OFV fosse considerado membro tipo de um novo gênero chamado de Dichorhabdovirus dentro da família *Rhabdoviridae*. Outro VTBr do tipo nuclear é o *Clerodendrum chlorotic spot virus* (CICSV), que embora apresente similaridades com o OFV, não se pode afirmar que ele faria parte do novo gênero proposto. Por outro lado, o genoma do CiLV-C demonstrou que este vírus não pode ser classificado como *Rhabdovirus*. Recentemente, o CiLV-C foi aceito como membro tipo do gênero *Cilevirus* (Carstens, 2010), conforme proposto por Locali-Fabris *et al.* (2006). No trabalho de Ferreira *et al.* (2007), alguns fragmentos do genoma do *Solanum violaeifolium* ringspot virus (SvRSV) demonstraram similaridade com o CiLV-C, mas para classificá-lo como um *Cilevirus* seriam necessários estudos adicionais.

Os métodos mais comuns para diagnóstico de doenças causadas por VTBs são análise de sintomas e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de tecidos infectados (Kitajima *et al.*, 2003a). Entretanto, estes métodos são inespecíficos e podem não ser confiáveis e, o MET é dispendioso e demorado. Durante a última década, alguns VTBs foram parcialmente sequenciados e, conseqüentemente, ferramentas baseadas em biologia molecular foram desenvolvidas para sua detecção *in planta* (Blanchfield *et al.*, 2001; Locali *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2009). O primeiro estudo de detecção molecular de VTBs em seus ácaros vetores é o relato preliminar de Locali *et al.* (2003), que conseguiram detectar o *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) por RT-PCR em amostras de 400 ácaros virulíferos. Novelli *et al.* (2007) testaram extração de RNA

de ácaros em amostras de 400, 200, 50, 20, 10, 5, 4, 3, 2 e 1 indivíduos virulíferos e verificaram que o número mínimo de 10 ácaros era necessário para detecção consistente do CiLV-C.

O aumento significativo no número (de quatro para mais de 40 nos últimos 15 anos) e importância dos VTBs levou a um aumento no número de estudos de interação hospedeiro-vírus-vetor (Bastianel *et al.*, 2010; Kitajima *et al.*, 2010).

Embora experimentos biológicos de transmissão dos VTBs por ácaros sejam realizados com certa frequência, existe uma inconsistência na obtenção de sintomas das doenças em plantas. Um dos problemas verificados nestes experimentos é a tendência dos ácaros caminharem em direção a cola *tanglefoot*, que delimita uma arena para as populações. Isso tem sido minimizado utilizando-se uma mistura de farinha de trigo, gesso, areia fina e água para proporcionar abrigo para o vetor (Rodriguez *et al.*, 2007). Levando em consideração que partículas virais se encontram disponíveis para a aquisição apenas nas lesões, outro inconveniente consiste em encontrar fontes de inóculo com lesões suficientes para assegurar a aquisição do vírus pelos ácaros.

Com o desenvolvimento da técnica que permite extrair RNA consistentemente a partir de apenas 10 ácaros, nós relatamos neste trabalho a detecção de quatro VTBs: CiLV-C, SvRSV, CICSV e OFV em seus vetores *Brevipalpus* spp. virulíferos utilizando *primers* específicos para cada um dos vírus. Além disso, estas extrações de RNA foram testadas para a detecção do CiLV-C em diferentes fases de desenvolvimento do *B. phoenicis*.

5.4. Material e Métodos

5.4.1. Material biológico

A detecção dos VTBs nos seus ácaros vetores foi testada após um período de aquisição de 5 dias. *B. phoenicis* foram alimentados em frutos de laranja ‘Pera’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) sintomáticos para leprose dos citros, ou folhas de *Clerodendrum speciosum* com sintomas de *Clerodendrum chlorotic spot*, enquanto *B. obovatus* e *B. californicus* foram alimentados em folhas de *Solanum violaeifolium*, com sintomas de *Solanum violaeifolium ringspot* e folhas de *Oncidium* spp. com sintomas de orchid fleck, respectivamente. Populações avirulíferas de *B. phoenicis* foram iniciadas a partir de ovos e mantidas em frutos sadios de laranja doce. Os ácaros *B. californicus* e *B. obovatus* avirulíferos foram coletados de plantas assintomáticas distantes de áreas infectadas. Cada vírus foi testado por RT-PCR com três amostras de dez ácaros cada.

5.4.2. Extração de RNA e RT-PCR

A extração de ácidos nucleicos de *Brevipalpus* spp. foi realizada utilizando o protocolo de Gibbs & Mackenzie (1997), com modificações. Amostras compostas de 10 ácaros (Novelli *et al.*, 2007) foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro e o RNA total foi extraído utilizando-se 50 µL de tampão CTAB [2% (w/v) *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*; 1,4 M de NaCl; 0,1M de Tris-HCl pH 8,0] contendo β-mercaptoetanol, homogeneizado e incubado à 55°C por 15 min. Cento e cinquenta µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foram adicionados em um tubo de 1,5 mL e homogeneizados com um vórtex seguido por centrifugação de 12.000 rpm à 4°C por 10 min. A fase aquosa foi cuidadosamente removida para um novo microtubo. Foi realizada uma segunda extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O

sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis e 1/10 de volume de 7,5 M NH₄Ac e 1 volume de isopropanol foram adicionados, misturados por inversão, e mantidos à –20°C por 15 min. A solução foi centrifugada à 12.000 rpm à 4°C por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 150 µL de etanol 70% preparado com água DEPC, seco em vácuo por 5 min e ressuspenso em 5 µL de água DEPC, sendo armazenado posteriormente à –80°C.

Os cDNAs foram sintetizados com *random primers* e transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. As PCRs foram realizadas com 1x tampão de reação, 1,8 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 200 nM de cada primer e água Milli-Q para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação para cada par de *primers* estão demonstrados na tabela 1. Para assegurar a especificidade dos *primers*, cada um dos pares foi testado com todos os VTBs estudados. cDNAs de plantas sadias e ácaros avirulíferos foram utilizados como controles negativos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x corados com brometo de etídio.

Este mesmo método de RT-PCR foi utilizado para avaliar seu potencial na detecção de vírus em diferentes estágios de desenvolvimento de ácaros. *B. phoenicis* virulíferos para o CiLV-C foram mantidos em frutos sintomáticos. Amostras de 100 ovos, 45 larvas, 10 ninfas e 10 adultos foram utilizadas para a extração de RNA e realização de RT-PCR para detecção viral como descrito anteriormente.

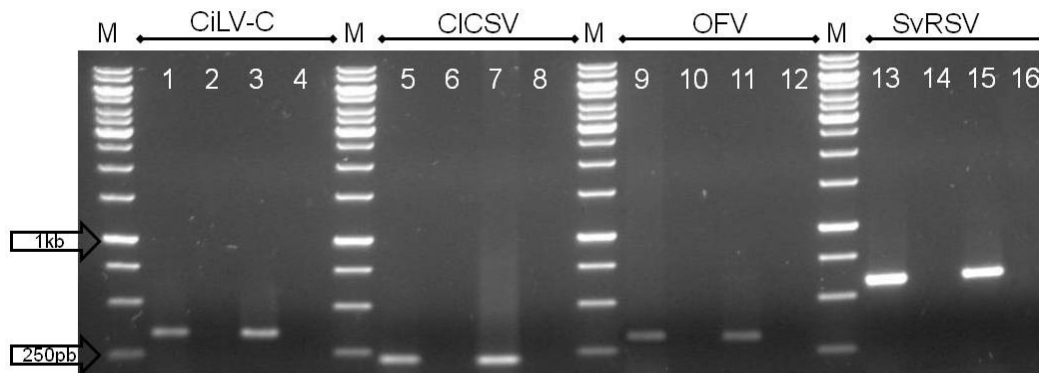
Tabela 1: Primers para RT-PCR e condições utilizadas para detector BTVs em ácaros do gênero *Brevipalpus*

BTV/ Tipo ¹		ácaro	Primer	Sequência do primer 3'-5'	t°C ² / produto (pb)	Referências
CiLV-C Proteína de movimento	C	<i>B. phoenicis</i>	MP-F	F - 5'-GCGTATTGGCGTTGGATTCTGAC-3'	56°C	Locali <i>et al.</i> , 2003
			MP-R	R - 5'-TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT-3'	339 pb	
SvRSV replicase	C	<i>B. obovatus</i>	SvRSV 1F	F - 5'-TGTCGAACTTGGTATGAGTCG-3'	52°C	Ferreira <i>et al.</i> , 2007
			SvRSV 2R	R - 5'-CCGGTTCGTCAAATAACTCC-3'	600 pb	
OFV nucleocapsideo	N	<i>B. californicus</i>	OFV-F	F - 5'-TGTCATAGCCGACATAAACACC-3'	58°C	Kubo <i>et al.</i> , 2009
			OFV-R	R - 5'-TGTCATAGCCGACATAAACACC-3'	326 pb	
CICSV polimerase	N	<i>B. phoenicis</i>	CICSV-F	F - 5'-AGTGTACCGCCTCACAGAAG-3'	58°C	This work ^{3,4}
			CICSV-R	R - 5'-CGGGGTCTTGTGTTCATAG-3'	219 pb	

¹C= citoplasmático; N=nuclear; ²Temperatura de anelamento; ³Mesmas condições as utilizadas para amplificar o fragmento do OFV; ⁴GenBank accession number HQ853700

5.5. Resultados e discussões

Foram observados fragmentos de aproximadamente 300 pb, 600 pb, 300 pb e de 200 pb, para CiLV-C, SvRSV, OFV e CICSV, respectivamente, apenas em ácaros virulíferos, resultando em bandas únicas correspondentes a cada um dos vírus nas diferentes amostras, enquanto ácaros avirulíferos e plantas sadias não resultaram em amplificação (Figura 2). Este resultado demonstra que 10 ácaros são suficientes para a detecção consistente de diferentes VTBs dos tipos citoplasmático e nuclear, como previamente demonstrado por Novelli *et al.* (2007) para o CiLV-C. Os testes cruzados utilizando os primers disponíveis para os VTB-Ns demonstraram especificidade para todos os *primers*, com exceção dos *primers* desenhados para a polimerase do CICSV que amplificam consistentemente um fragmento do CoRSV, embora o contrário não ocorra (Figura 3).



Fonte: Kubo et al., 2011

Fig. 2 - M = O'GeneRuler™ DNA Ladder 250 - 10000 bp (Fermentas). Linhas: **1, 5, 9, 13** – ácaros virulíferos; **2, 6, 10, 14** – ácaros avirulíferos; **3, 7, 11, 15**- folhas dos hospedeiros com lesões; **4, 8, 12, 16**- folhas sadias.

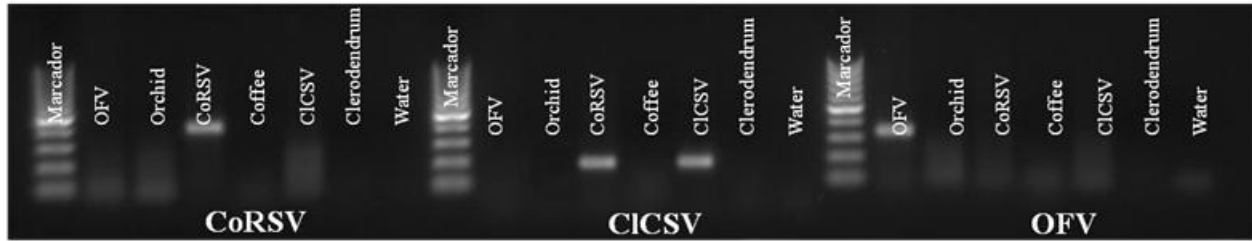


Fig. 3 – Teste cruzados de VTBs com os primers disponíveis até essa data - Marcador - 1Kb (Fermentas)

Adicionalmente, este método foi eficiente para a detecção do CiLV-C em todos os estágios do *B. phoenicis*, criados em uma fonte de inóculo (Figura 4). Em amostras de larvas e ninfas, os padrões de amplificação foram consistentes para todas as amostras, assim como para adultos. Entretanto, não foi observada amplificação em ovos de ácaros virulíferos, corroborando os dados de Boaretto *et al.* (1993) que, ao contrário do que havia sido previamente relatado por Knorr, (1968), sugerem que este vírus não é transovarialmente transmitido. Estes resultados demonstram a viabilidade de utilizar este método para estudos de transmissão, incluindo a detecção em diferentes estágios de vida e monitoramento da aquisição viral. Adicionalmente, a capacidade de detectar consistentemente a presença destes vírus em seus vetores utilizando apenas 10 ácaros é extremamente desejável para estudos de campo, assim como para condições experimentais.

Essa técnica de extração de RNA e amplificação está sendo utilizada para a verificação de quantidade de partículas virais do CiLV-C por RT-qPCR (Novelli, V.M, *comunicação pessoal*), para a avaliação de replicação do CiLV-C e do Coffee ringspot virus (CoRSV) em seu ácaros vetores (Costa, *et al.*, *comunicação pessoal*).

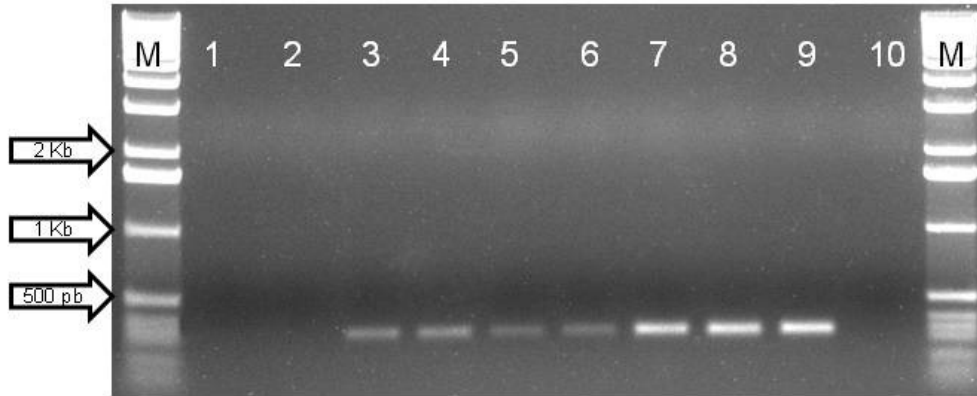


Fig. 4 – Detecção de CiLV-C em amostras de ácaros em diferentes estádios de desenvolvimento utilizando primers específicos para a proteína de movimento (MP). **M** = 1 kb ladder marker (Invitrogen); linhas **1, 2** - ovos; **3, 4** - larvas; **5, 6** - ninfas; **7, 8** - adultos; **9** = controle positivo de cDNA de plantas infectadas com o CiLV-C; **10** – ácaros avirulíferos para CiLV-C.

5.6. Conclusão

A detecção por RT-PCR de VTBs em populações criadas em condições de laboratório indica o potencial em monitorar populações virulíferas de *Brevipalpus* spp., o que pode ser uma contribuição importante para o entendimento da epidemiologia da doença (Bassanezi e Laranjeira, 2007). O período necessário para o aparecimento de sintomas de plantas infectadas com VTBs pode ser superior a 4-5 semanas. Sendo assim, tecidos inoculados com VTBs por ácaros e ainda assintomáticos, podem servir como fonte de vírus, como demonstrado para o CiLV-C (Boareto e Chiavegato, 1994). Então, a detecção de VTBs em ácaros, mesmo em plantas assintomáticas, podem fornecer informações importantes para o manejo de doenças causadas por estes vírus, e especialmente em relação à decisão para a aplicação de acaricidas. Por outro lado, a presença de partículas virais em ácaros pode significar que os ácaros adquiriram o vírus, mas não que eles serão necessariamente transmitidos. Estudos adicionais em detalhes da relação VTB x vetores são

necessários para uma correlação correta da detecção dos vírus em ácaros e a transmissão da doença.

Neste estudo, nós demonstramos que este método pode ser eficiente e especificamente utilizado para a detecção de CiLV-C, OFV, SvRSV e ClCSV em seus ácaros vetores e possivelmente para outros VTBs. Com base na alta especificidade e reprodutibilidade de PCR, esta metodologia é confiável para a detecção viral e estudos epidemiológicos anteriores ao aparecimento de sintomas no campo, principalmente para doenças de culturas economicamente importantes.

Capítulo 2

6. EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM RESPOSTA AO CiLV-C

6.1. Resumo

A leprose dos citros é um patossistema complexo que envolve um ácaro vetor e um vírus que permanece confinado em lesões localizadas. Existem diferentes níveis de resistência a doença, sendo o tangor ‘Murcott’ considerado resistente, enquanto que a laranja ‘Pera’ é considerada suscetível. Com o objetivo de se encontrar diferenças na expressão de genes relacionados à resistência ao CiLV-C, foram utilizadas análises de microarranjo com lâminas customizadas desenvolvidas utilizando-se 32.121 unigenes de laranja ‘Pera’ (*C. sinensis*), 18.873 de tangerina ‘Poncan’ (*C. reticulata*) e 12.873 de *Poncirus trifoliata* do *Citrus* EST database (CitEST) para avaliar a laranja ‘Pera’ e o tangor ‘Murcott’ em resposta à interação do entre o efeito do CiLV-C e o efeito do genótipo. As análises estatísticas foram realizadas por *two-way* ANOVA e os resultados foram caracterizados por *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), possibilitando o desenvolvimento da hipótese de que existem receptores como o *receptor-like proteins* (RLP) e o *receptor-like kinase* (RLK) que reconhecem o vírus ou o ácaro, disparando uma resposta de defesa baseada no reconhecimento de assinaturas de Ca^{2+} e ativação subsequente da via de sinalização do ácido salicílico, que resultaria em resistência sistêmica adquirida (SAR) ou desenvolvimento de lesões de hipersensibilidade (HR).

Palavras chave: leprose dos citros, respostas de defesa, microarranjo.

6.2. Abstract

Citrus leprosis is a complex pathosystem that involves a mite vector and a virus that remains confined to the localized lesions it induces in susceptible hosts. There are different levels of resistance to the disease and tangor 'Murcott' is considered highly resistant while 'Pera' sweet orange is considered highly susceptible. Aiming to find differences in gene expression related to the resistance against CiLV-C, we used a customized microarray chip containing 32,121 'Pera' sweet orange (*C. sinensis*) unigenes, 18,873 'Poncan' mandarin (*C. reticulata*) unigenes and 12,873 *Poncirus trifoliata* unigenes analyses using the *Citrus* EST database (CitEST) to evaluate 'Pera' sweet orange and 'Murcott' tangor response to the interaction of the effects of CiLV-C and the genotype. The statistical analysis was performed by *two-way* ANOVA and the results were characterized by *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) enabling the development of a hypothesis that suggests that there are receptor-like proteins (RLP) and receptor-like kinase (RLK) that may recognize the virus or the mite triggering a defense response based on Ca^{2+} signature and activation of salicylic acid pathway (SA). The activation of SA pathway may result in systemic acquired resistance (SAR) or hypersensitive response (HR).

Keywords: citrus leprosis, defense responses, microarray.

6.3. Introdução

A leprose dos citros é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), recentemente aceito como membro tipo do novo gênero proposto *Cilevirus* (Locali *et al.*, 2006; Carstens, 2010). O CiLV-C é um vírus incomum, que permanece confinado em lesões sem apresentar infecção sistêmica (Bassanezzi e Laranjeira, 2007). Este vírus causa lesões cloróticas ou necróticas em folhas, ramos e frutos e é transmitido pelos ácaros Tenuipalpídeos *Brevipalpus phoenicis* (Musumessi e Rosseti, 1963). Plantas muito afetadas apresentam queda prematura de frutos e morte de ramos (Frezzi, 1940; Bitancourt, 1955).

O CiLV-C causa a doença viral de maior importância no Brasil (Bastianel *et al.*, 2010). As laranjas doces, que totalizam quase 80% dos pomares de São Paulo, são consideradas altamente susceptíveis à doença (Bastianel *et al.*, 2008). Existem diversas fontes de resistência descritas em tangerinas e seus híbridos (Bastianel *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2003), e alguns híbridos de tangerinas com laranja doce, como o tangor ‘Murcott’, exibem alta resistência à leprose em condições de campo e casa de vegetação (Bastianel *et al.*, 2004).

Com o avanço da doença em direção ao norte atingindo o Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Guatemala, Honduras, El Salvador e o México (revisado por Bastianel *et al.*, 2010), existe o risco da re-introdução da doença nos Estados Unidos e nas ilhas caribenhas (Childers *et al.*, 2003).

Uma maneira de se diminuir o impacto de uma doença é entender os mecanismos de defesa de genótipos resistentes. Os vírus utilizam várias estratégias para infectar seus hospedeiros como: formação de complexos de replicação (Hills *et al.*, 1987), supressão de silenciamento gênico pós-transcricional (Voinnet, 2001), e interferência na regulação dos ciclos celulares vegetais (Gutierrez, 2000). Por outro lado, as plantas reagem à infecção se seus mecanismos de defesa

forem eficientes com a ativação de respostas de hipersensibilidade (Mur *et al.*, 2008) e da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Durrant e Dong 2004; Seo *et al.*, 2004).

Métodos de análises de expressão gênica em grande escala como os microarranjos permitem a comparação massiva de dados e foram utilizados para estudar as respostas de *Arabidopsis* ao *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV - Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008), *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Golem e Culver, 2003) e ainda outros vírus de RNA (Whitham *et al.*, 2003). Em citros, esta técnica foi utilizada para avaliar os efeitos de isolados severos e fracos de CTV em limão tahiti (*Citrus aurantifolia*) (Gandia *et al.*, 2007).

Seguindo essa estratégia, escolhemos comparar a expressão diferencial de hospedeiros suscetíveis (laranja ‘Pera’) e resistentes (tangor ‘Murcott’) ao CiLV-C por microarranjos.

6.4. Material e métodos

6.4.1. Experimentos biológicos

Com o objetivo de avaliar as respostas à injúria causada pela alimentação do ácaro e à infecção pelo CiLV-C em indivíduos suscetíveis e resistentes, foi elaborado um experimento realizado em casa de vegetação.

O experimento consistiu de três plantas de tangor ‘Murcott’ (resistentes ao CiLV-C) e três de laranja doce ‘Pera’ (susceptíveis ao CiLV-C), todas infestadas com ácaros virulíferos e outras três plantas de cada genótipo infestadas com ácaros avirulíferos (Fig.1 e Fig.2). Cada planta teve três folhas isoladas com a cola entomológica tanglefoot e preparadas com a mistura de farinha, gesso e areia descrita por Rodriguez *et al.* (2007), de forma a propiciar melhor abrigo para os ácaros e impedir que saíssem das folhas infestadas. Os ácaros avirulíferos foram provenientes de

populações obtidas através de ovos e mantidas em frutos sadios no Laboratório de Acarologia do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC. Ácaros virulíferos foram obtidos pela transferência de ácaros avirulíferos para frutos com sintomas de CiLV-C e mantidos sobre eles por um período de quinze dias. As folhas infestadas foram lavadas com água, coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido 48 horas após a infestação (Fig. 2), sendo armazenadas à -80°C para extração de RNA e envio para a Roche NimbleGen. A coleta foi realizada 48 h após infestação com base em trabalhos anteriores de respostas de defesa de plantas ao CiLV-C realizados por Freitas-Astúa *et al.* (2007) e Bastianel *et al.*, *comunicação pessoal*.

Além do teste das populações em amostragem para se verificar a aquisição do vírus pelo vetor, na tentativa de minimizar as variáveis de aquisição e transmissão que podem afetar esse tipo de experimento, antes da coleta das folhas para a extração de RNA, três repetições de dez ácaros foram coletadas de cada tratamento (ou seja, conjunto de três repetições biológicas) para a realização de extração de RNA e RT-PCR com *primers* para a proteína de movimento (MP) (Locali *et al.*, 2003; Kubo *et al.*, 2011) para a confirmação da presença do vírus nos ácaros.

Para avaliar os resultados do microarranjo e a dinâmica de alguns genes ao longo de um *time course*, um novo experimento biológico foi instalado. Este experimento contou com quatro repetições biológicas e cada folha foi infestada com dez ácaros virulíferos ou avirulíferos (Figura 1). A coleta do material vegetal foi realizada 1h, 6h, 12h, 24h, 48h, uma semana após infestação e após o desenvolvimento de sintomas (Fig. 3).

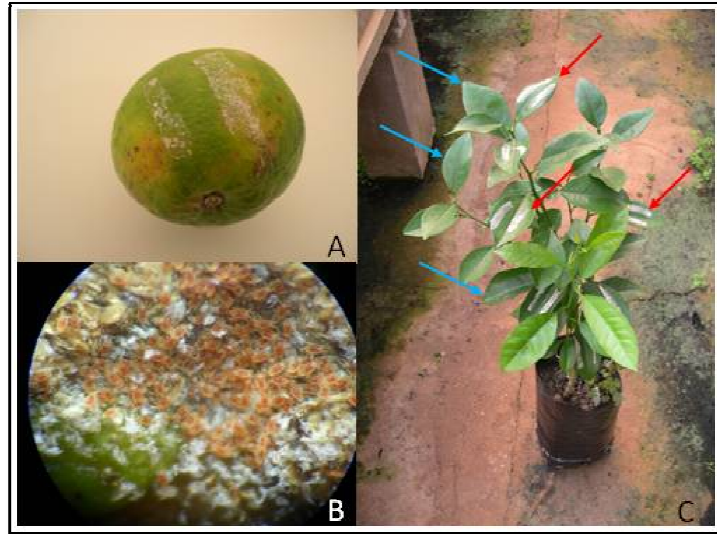


Fig. 1 – Esquema de infestação de plantas de laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ com ácaros *B. phoenicis*. **A** - Fruto de laranja ‘Pera’ utilizado para a multiplicação de *B. phoenicis* virulíferos para CiLV-C. **B** - Observação em aumento de 20x de um fruto utilizado para a multiplicação de *B. phoenicis* virulíferos para CiLV-C. **C** - Planta infestada com ácaros. Setas vermelhas indicam as folhas infestadas com ácaros enquanto as azuis indicam as folhas não infestadas.

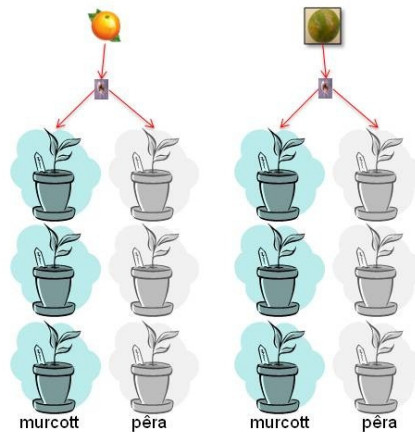


Fig. 2: Desenho experimental de experimento de casa de vegetação. Vasos verdes representam plantas de tangor ‘Murcott’ e os cinzas de laranja doce e a laranja alaranjada representa o local de multiplicação de ácaros avirulíferos, enquanto a verde demonstra o local de multiplicação de ácaros virulíferos.

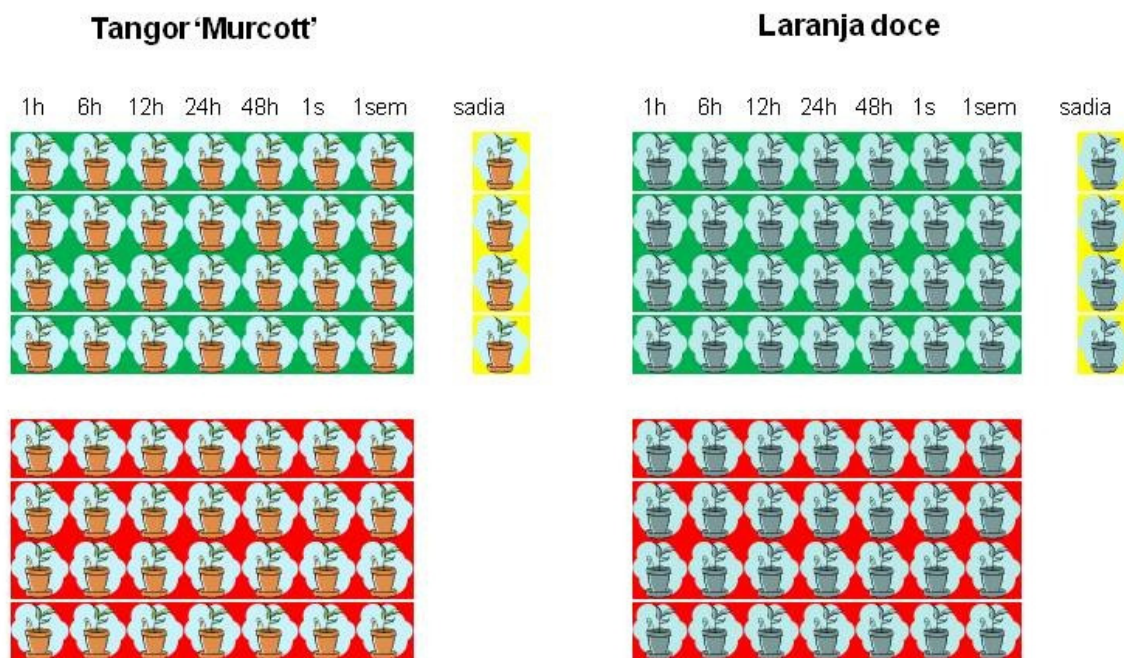


Fig. 3 – Desenho experimental de experimento de casa de vegetação. Os quadrados verdes representam plantas infestadas com ácaros virulíferos para o CiLV-C e os vermelhos representam plantas infestadas com ácaros avirulíferos. Os quadrados amarelos representam plantas controle não infestadas.

6.4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total do material vegetal foi realizada com o *RNeasy plant mini kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para evitar contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com *RNase-free DNase set* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado em um *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (Thermo Scientific) e sua integridade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose desnaturante contendo formaldeído (Sambrook *et al.*, 2001).

A síntese de cDNA foi realizada segundo instruções do manual do *Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) com a utilização de *primers* randômicos (Fermentas), a partir de 1µg do RNA total.

6.4.3. Análises de expressão em microarranjos

A construção dos microarranjos, assim como as hibridizações, foram terceirizadas e realizadas pela empresa Roche NimbleGen (Reyjavik, Islândia). As lâminas de microarranjos foram sintetizadas com oligonucleotídeos de 60 bases, sendo cada gene representado seis vezes no microarranjo por três sondas diferentes. As lâminas de microarranjos continham 32.121 unigenes de laranja ‘Pera’ (*C. sinensis*), 18.873 de tangerina ‘Poncan’ (*C. reticulata*) e 12.873 de *Poncirus trifoliata*, perfazendo um total de 383.202 *spots*. Vinte microgramas de RNA total de três repetições biológicas de plantas de laranja doce infestadas com ácaros virulíferos para o CiLV-C e outras três infestadas com ácaros avirulíferos, três repetições biológicas de plantas de tangor ‘Murcott’ infestadas com ácaros virulíferos para o CiLV-C e outras três infestadas com ácaros avirulíferos com qualidade confirmada em *Bioanalyser 2110* (Agilent), foram enviados para síntese de cDNA e hibridização na empresa Roche NimbleGen.

De acordo com os protocolos da NimbleGen, foram empregados 10 µg do RNA total de cada amostra experimental. A síntese de cDNA foi realizada com o *SuperScript II cDNA Conversion Kit* (Invitrogen). O cDNA de fita dupla foi sintetizado com *random primers* marcados com o fluoróforo de cianina Cy3-*nonamers* e hibridizado aos microarranjos por 16 horas à 42°C. Os arrays foram lavados, secos e escaneados com uma resolução de 5 µm utilizando o *GenePix 4000B microarray scanner* (Molecular Devices). Os dados foram extraídos das imagens geradas utilizando-se o software *NimbleScan* (Roche NimbleGen). Para o processamento dos dados, foi

empregado o método RMA (*Robust Multiarray Average*) proposto por Irizarry *et al.* (2003), que agrega três etapas: sumarização do sinal das sondas *perfect match* (PM); correção de *background* pelo modelo de mistura normal-exponencial; e escalonamento entre lâminas (normalização) pelo método *Quantile Normalization* (Bolstad *et al.*, 2003).

6.4.4. Análise estatística

Os dados pré-processados foram importados para realizar as análises estatísticas, onde o desenho factorial de 2 x 2 para cada combinação de tratamentos foi observada: (1) – Pa, laranja ‘Pera’ infestada com ácaros avirulíferos; (2) – Pv, laranja ‘Pera’ infestada com ácaros virulíferos; (3) – Ma, tangor ‘Murcott’ infestado com ácaros avirulíferos; e, (4) – Mv, tangor Murcott’ infestado com ácaros virulíferos; o que permitiu a estimativa de parâmetros para cada gene por *two-way* ANOVA, considerando-se o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro (dado pelo valor estimado de Ma - Pa), o efeito da infecção por CiLV-C (dado pelo valor estimado de Pv - Pa), e a interação entre ambos (dado pelo valor estimado de (Mv – Pv) – (Ma - Pa), por isso também conhecido como “diferença das diferenças”), representados esquematicamente na Figura 4. Embora seja tentador sugerir que a comparação entre Pv e Pa e Mv e Ma possibilitaria a visualização do efeito do vírus isoladamente, deve-se atentar ao fato de que esse seria um resultado não condizente com a realidade do patossistema. Para tanto, foi utilizado o *software R versão 2.9.22* (R Development Core Team 2009), pacote *limma* do *Bioconductor* (Smyth, 2004), inferências dadas pelo teste-T moderado e teste T-Bayesiano (Smyth, 2005), com correção para testes múltiplos do tipo FDR, *False Discovery Rate* (Benjamini e Hochberg, 1995), onde genes com FDR abaixo de 5% foram considerados diferencialmente expressos para cada efeito considerado na comparação e o FDR abaixo de 10% foi utilizado como limite de corte da interação. O *Gene Set Enrichment Analysis* (Alexa *et al.*, 2006) foi empregado na caracterização

das lista de genes diferencialmente expressos utilizando anotação de *Gene Ontology* de ortólogos de *Arabidopsis thaliana* para encontrar as funções biológicas mais relevantes entre os grupos mais representados na fase primária da análise.

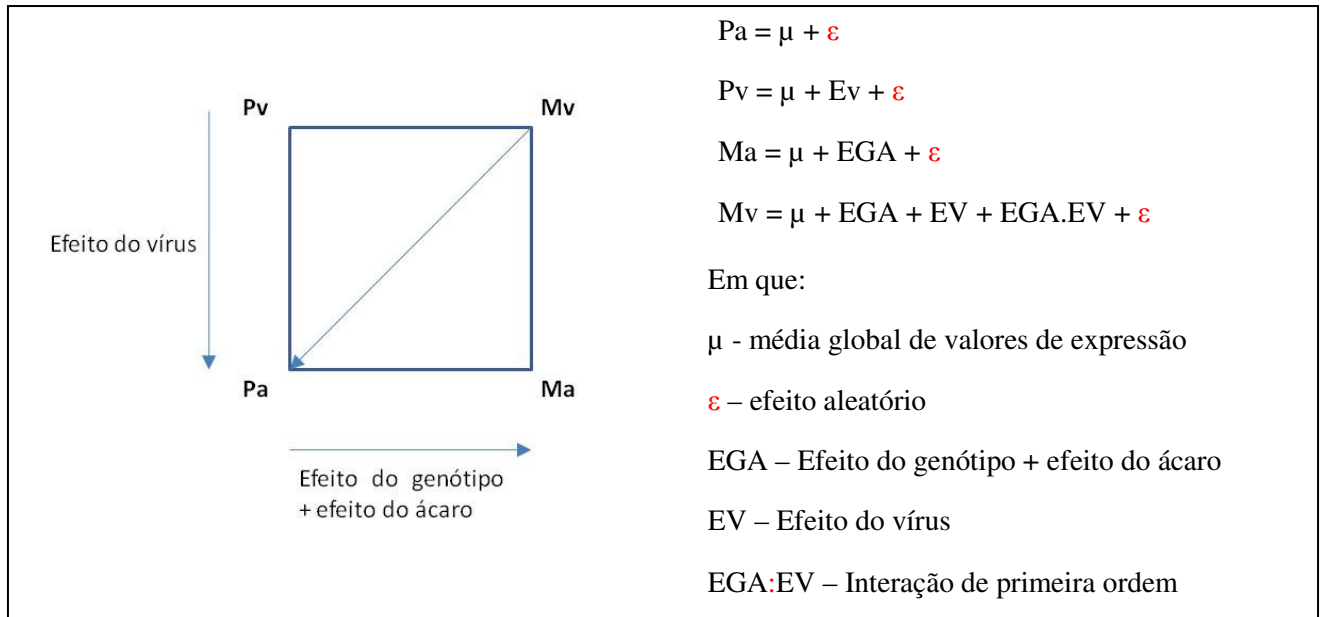


Fig. 4: Esquema da interpretação dos dados de microarranjo por *two-way* ANOVA. **Pv** – laranja ‘Pera’ infestada com ácaros virulíferos para CiLV-C, **Pa** - laranja ‘Pera’ infestada com ácaros virulíferos, **Mv** – tangor ‘Murcott’ infestada com ácaros virulíferos para CiLV-C, **Ma** – tangor ‘Murcott’ infestada com ácaros avirulíferos para CiLV-C.

6.4.5. RT-qPCR

6.4.5.1. Desenho de *primers*

Os *primers* utilizados neste trabalho foram desenhados no software *Primer Express v.2.0* (Applied Biosystems) e suas especificidades foram analisadas entre plantas com o software *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Após a formulação da hipótese proposta a partir do resultado dos dados por *two-way* ANOVA, foram selecionados dez genes diferencialmente expressos no efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C para validação dos microarranjos, escolhidos de acordo com sua possível participação na resistência a leprose dos citros. Além destes, foram selecionados mais dois genes para dar suporte à hipótese proposta.

6.4.5.2. Amplificações e análise de dados de qPCR

As amplificações por RT-qPCR foram realizadas com o Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems), 5 µL de cDNA (diluição de 1:50), 200 nM de cada *primer* e volume final de 25 µL em um equipamento ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems) com ciclos de: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Para cada reação foi realizada uma curva de dissociação para verificação de possíveis contaminações e reações inespecíficas.

Ainda não existe um procedimento padrão para padronizar a análise dos resultados para aumentar a significância dos resultados. O método mais difundido para esta análise é o do $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), baseado unicamente em valores de Ct. Este método pode não ser muito confiável na comparação de quantidades de DNA, uma vez que assume que a eficiência de amplificação de todos os genes é a mesma e máxima, igual a 2. Uma alternativa atraente ao método do $2^{-\Delta Ct}$ requer o ajuste de curvas sigmóides aos dados de fluorescência nos diversos ciclos de amplificação de cada amostra (Fig. 5). Nesse, os valores de Ct, usados nas quantificações relativas (em relação a um controle endógeno) são substituídos por valores de Cp, referentes a um ponto característico pertencente à fase exponencial de amplificação, geralmente o ciclo equivalente ponto de máxima da segunda derivada da curva de acúmulo de fluorescência, e a eficiência de cada

reação de amplificação pode ser estimada a partir do modelo sigmoide ajustado (Rebrikov e Trofimov, 2007). Seguindo esta segunda abordagem de quantificação, os dados brutos de fluorescência das duplicatas técnicas de cada amostra foram utilizados para o ajuste em curvas sigmóides (Spiess et al., 2008) no pacote estatístico R versão 2.922 (R Development Core Team 2009).

O ciclo de quantificação, dados pelo *crossing point* (Cp), foi determinado para cada curva de amplificação pelo ponto máximo da segunda derivada da curva sigmoide ajustada (Figura 5). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada pela razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior. A estimativa de eficiência para cada par de *primers*, ou cada gene, foi obtida pela eficiência média calculada para cada gene.

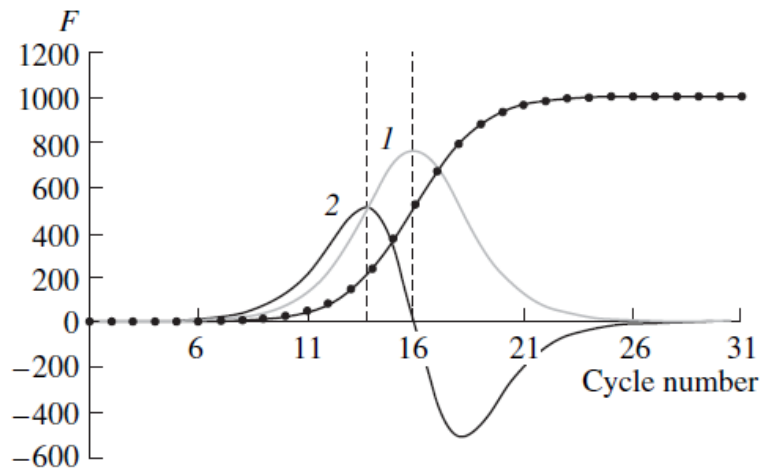


Fig. 5 – Gráfico de acúmulo de DNA, primeira (1) e segunda (2) derivadas do gráfico. A linha vertical pontilhada designa as posições da primeira e da segunda derivadas. Gráfico do trabalho de Rebrikov e Trofimov (2006).

6.4.5.3. Teste de genes normalizadores para RT-qPCR

Os genes escolhidos como controles endógenos para a análise de RT-qPCR foram: β -tubulina, β -actina, *ETEF2*, ubiquitina e ciclofilina. A β -tubulina e a β -actina são genes utilizados rotineiramente para normalizar dados de RT-qPCR. Os genes *ETEF2*, ubiquitina e ciclofilina foram escolhidos com base no trabalho de Boava *et al.* (2010). Seqüências de genes homólogos em citros foram recuperadas do banco de dados CitEST e os *primers* para a amplificação destes genes assim como suas seqüências fazem parte dos trabalhos de Boava *et al.* (2011) e Mafra *et al.* (submetido).

Os níveis de expressão e estabilidade de quatro genes candidatos foram avaliados em: Laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ sadias e híbridos (laranja ‘Pera’ x tangor ‘Murcott’) resistentes e suscetíveis ao CiLV-C infestados com ácaros *Brevipalpus phoenicis* virulíferos para a leprose dos citros. Os níveis de expressão foram calculados utilizando-se o algoritmo *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), que calcula para cada gene um valor de estabilidade de expressão (*M-value*), dado pela média da variação par-a-par entre um gene e outros candidatos, no *software GenEx version 5.0.1.5* (www.multid.se). Os genes que apresentaram menor *M-value*, genes de maior estabilidade de expressão, na comparação foram selecionados como normalizadores para os experimentos de RT-qPCR.

6.4.5.4. Análises estatísticas dos dados de RT-qPCR

O ajuste em curvas sigmóides e o cálculo de eficiência foram realizados para cada par de *primers*, os dados gerados pela amplificação de cada gene por RT-qPCR foram normalizados com os genes β -tubulina e ubiquitina. A comparação entre grupos foi realizada seguindo a análise de microarranjo no *Bioconductor’s limma package* (Smyth, 2004), por *two-way* ANOVA,

considerando-se o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro, o efeito da infecção por CiLV-C e a interação entre ambos. Os resultados apresentados a seguir, referem-se ao efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C.

6.5. Resultados e Discussão

6.5.1. Experimentos biológicos – Detecção de partículas virais em ácaros e em plantas

Os dados de detecção do CiLV-C acrescidos da otimização da detecção de outros VTBs em seus ácaros vetores, e a detecção do CiLV-C em diferentes estágios de desenvolvimento do *Brevipalpus phoenicis* descritos no capítulo 1.

O desenvolvimento de sintomas em plantas de laranja ‘Pera’, susceptíveis ao CiLV-C, ocorreu 17 dias após a infestação com ácaros virulíferos (Figura 6). As plantas de tangor ‘Murcott’ infestadas com ácaros virulíferos, assim como todas as plantas infestadas com ácaros avirulíferos, não apresentaram sintomas.

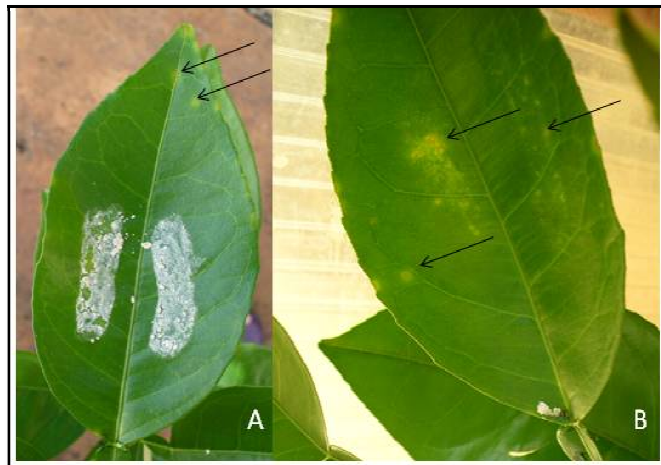


Fig.6: Sintomas indicados pelas setas, causados por CiLV-C em laranja ‘Pera’ 17 dias após infestação. **A** – Folha com mistura de farinha, gesso e areia. **B** – Folhas após a lavagem para a retirada da mistura de farinha, gesso e areia.

Alguns sintomas provenientes de folhas de laranja ‘Pera’ e partes aleatórias de folhas de tangor ‘Murcott’ foram utilizados para RT-PCR utilizando-se os pares de primers de Locali et al. (2003) para o gene da proteína do movimento (MP) do CiLV-C. Apenas os sintomas de laranja ‘Pera’ apresentaram amplificação do fragmento esperado. Embora plantas de tangor ‘Murcott’ possam apresentar infecção assintomática por CiLV-C, não foi possível detectar o vírus, pela sua ausência ou baixa concentração dos locais avaliados (dados não demonstrados).

6.5.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total extraído das amostras apresentou qualidade e concentração satisfatórias para as hibridizações por microarranjo (Figura 7).

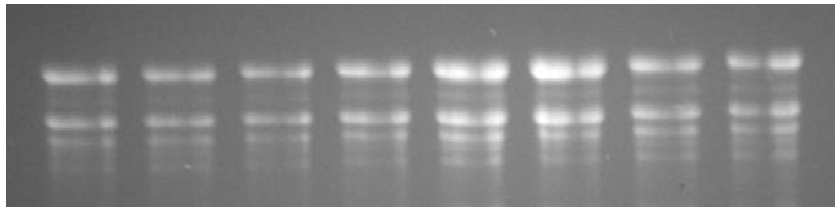


Fig. 7. Padrão eletroforético em gel de agarose desnaturante 2% FA 1X de uma alíquota contendo 2 μ L de RNA de folhas de laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’.

6.5.3. Análises de microarranjo

Plantas de laranja ‘Pêra’ (S) e tangor ‘Murcott’ (R) foram infestadas com ácaros virulíferos ou avirulíferos para CiLV-C, com o intuito de se observar genes diferencialmente expressos 48h após a transferência de ácaros. O material foi utilizado em microarranjos de cDNA e foi analisado por *two-way* ANOVA ($p\text{-value} \leq 0.1$ e $|\log\text{-fold-change}| \geq 1$), onde 80 genes diferencialmente expressos foram significativos para o efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C. Este resultado foi submetido à análise por GSEA de forma a identificar os processos biológicos enriquecidos nos contrastes de interesse. Entre os genes diferencialmente expressos, foi possível encontrar 67 ortólogos a genes de *Arabidopsis thaliana*, sendo 56 induzidos e 11 reprimidos.

De maneira geral, os processos biológicos enriquecidos por GSEA (Alexa et al., 2006) demonstram o que ocorreu um aumento de expressão na interação EGA:EV em genes associados à processos biológicos envolvidos com respostas de defesa como por exemplo: regulação positiva de resposta de defesa, resposta à estresse, resposta imune, respostas de defesa contra fungos, resposta a quitina, etc. Este fato demonstra que plantas resistentes e suscetíveis respondem de maneira diferente à infecção por CiLV-C. As categorias dos processos biológicos enriquecidos parecem ser comuns a outros vírus e patógenos. Isso pode decorrer do aumento de expressão de genes como *WRKY40*, *WRKY53* e *WRKY70*, que são relevantes em diferentes processos e já foram descritos em respostas de defesa a diferentes patógenos. No entanto, o único gene encontrado diferencialmente expresso na categoria de regulação de respostas de defesa contra vírus foi o *WRKY40*. A contagem esperada de genes dentro de um dado processo biológico foi dada com base na quantidade de genes envolvidos em cada processo representados na lâmina de microarranjo, enquanto a contagem observada resulta da quantidade de genes diferencialmente expressos pertencentes a esse processo biológico encontrados para o efeito da interação EGA:EV. A representação da contagem esperada e observada de genes relacionados a cada processo biológico relevante pode ser observada na figura 8 e na tabela 1.

Com base nos processos biológicos enriquecidos encontrados nas análises de microarranjo, pode-se verificar que genes que codificam para as proteínas *PUB22*, *PUB29*, *Arabidopsis tóxicos para levedura (ATL)*, *receptor-like kinase (RLK)*, *receptor-like protein (RLP)* e a calmodulina *CML41* foram encontrados induzidos, enquanto a peroxidase 58 (*Pox 58*) foi encontrada reprimida na análise considerando-se o efeito da interação EGA:EV. De acordo com vias de sinalização propostas para outros patossistemas (figura 9), poderia-se sugerir que *RLK* e *RLP* seriam receptores de sinais associados ao ácaro (supondo-se que o reconhecimento da injúria causada pela alimentação do ácaro seja mais inicial do que a infecção do vírus) ou ao CiLV-C. A ideia de que os

receptores possam reconhecer o ácaro encontram suporte no fato de que tanto o gene que codifica a *ATL2* (Arimura e Maffei, 2010) quanto o que codifica a *PUB22* (Trujillo et al., 2008) já foram encontrados em resposta à quitina (presente em grande quantidade em artrópodos). Poderia-se ainda supor que o reconhecimento do ácaro ocorreria por meio de *herbivory-associated molecular patterns* (*HAMPS*), como alguns derivados de ácidos graxos presentes na saliva de insetos (Schäffer et al., 2011) e, possivelmente, de outros artrópodos, como ácaros.

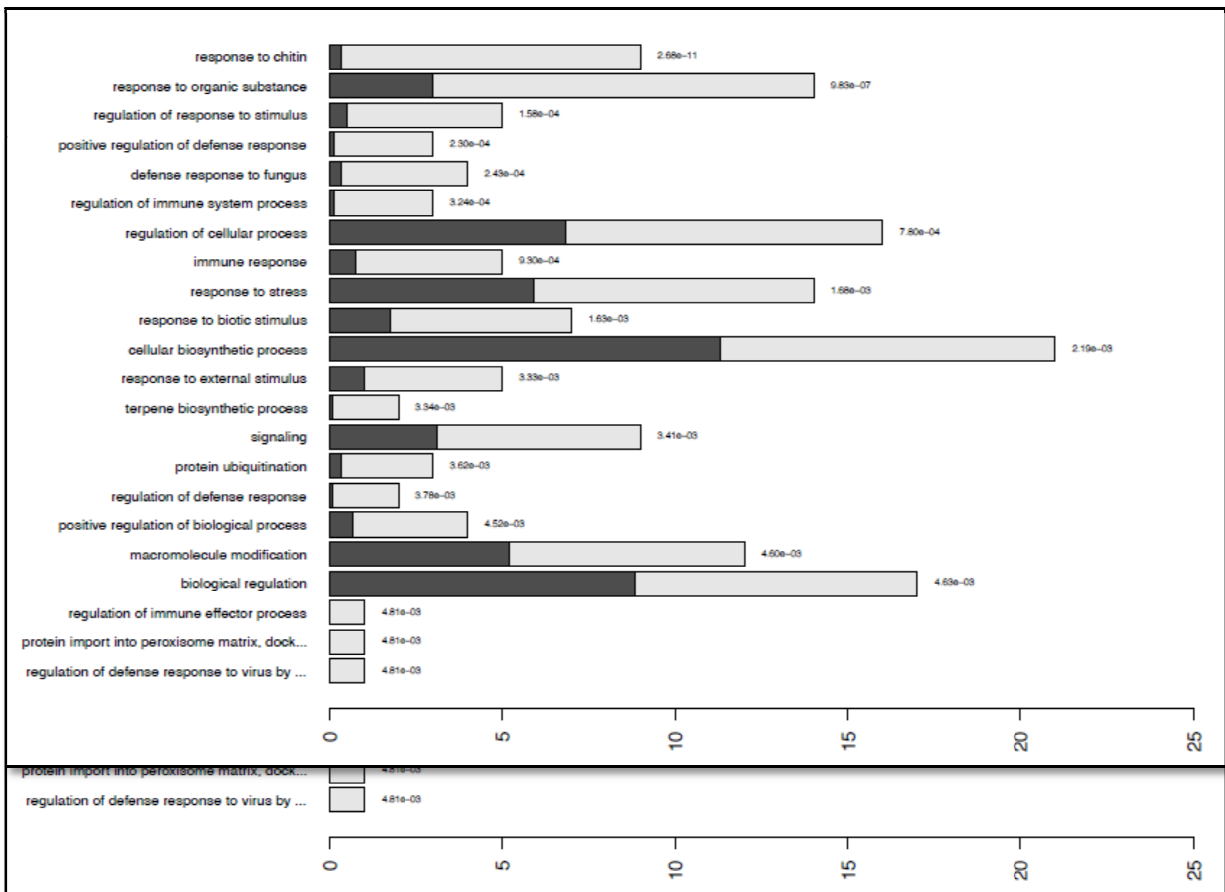


Fig.8: Conjunto de Processos Biológicos Enriquecidos envolvidos com resposta à infecção por CiLV-C e injúria causada pela alimentação de *B. Phoenicis* em laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ obtidos à partir da lista de genes diferencialmente expressos, genes apresentados no *chip* de microarranjo e informação do *Gene Ontology*. As barras escuras representam o número esperado de genes diferencialmente expressos em cada processo biológico e as barras claras representam a

contagem de genes diferencialmente expressos observados em cada processo biológico: o p-valor do teste hipergeométrico para cada processo biológico está representado ao lado das barras.

O trabalho de Trujillo et al. (2008) relata que os *PUBS22*, *23* e *24* agem como reguladores negativos de resposta do tipo PTI a diversos *PAMPs*, e podem ser induzidos tanto por *PAMPs* quanto pela infecção de patógenos. O *PUB22* foi encontrado induzido em plantas de tangor ‘Murcott’ infectadas com o CiLV-C, possivelmente respondendo a *PAMPs*. O *PUB22* foi ainda associado à diminuição do estresse oxidativo (ROS) (Trujillo et al., 2008), fato que pode ser reforçado pela peroxidase 58 ter sido encontrada reprimida.

O reconhecimento de *PAMPs*, *MAMPs*, *HAMPs* e *damage-associated molecular patterns* (*DAMPs*) (Segonzac and Zipfel, 2011) causam diferentes acúmulos de Ca^{2+} no citoplasma vegetal, denominados assinaturas de cálcio (McCormack e Braam, 2003), que podem ativar diferentes vias de sinalização, incluindo SA. A *Calmodulin-like protein* (*CML41*) é um importante sensor capaz de decodificar assinaturas de Ca^{2+} e sua presença entre os genes diferencialmente expressos pode indicar que este processo pode estar envolvido na resposta de defesa ao CiLV-C. A sinalização por Ca^{2+} pode ser mediada pela cascata da *MAPK*, ainda não inteiramente caracterizada. Fatores de transcrição relacionados à via do ácido salicílico como a *WRKY53* (Kalde et al., 2003) e a *WRKY70* (Li et al., 2004) também foram encontrados positivamente regulados em plantas de tangor ‘Murcott’.

Com o intuito de se verificar as vias de sinalização de respostas de defesa envolvidos com a resistência ao CiLV-C, genes relacionado a via do SA foram considerados para possibilitar a formulação de uma hipótese (Figura 8). Os genes *CC-NBS-LRR* (Vlot et al., 2009), *RLP3* (Tör et al., 2009; Wang et al., 2009), *RLK* (Tör et al., 2009; Segonzac e Zipfel, 2011), *PUB22* (Trujillo et al., 2008), *CML41* e *WRKYs* (Dong et al., 2003; Li et al., 2006, Knoth et al. 2007) foram encontrados em diferentes trabalhos e já foram descritos envolvidos na via do SA.

Tabela 1: Processos Biológicos enriquecidos significativamente ($p\text{-valor} \leq 0.01$) na resposta à infecção por CiLV-C e injúria causada pela alimentação de *B. Phoenixis* em laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ obtidos à partir da lista de genes diferencialmente expressos.

GO/termo	P valor	Nº Genes DE/		Razão entre quantidades de genes DE induzidos/reprimidos	Razão entre valores de logFC de genes DE induzidos/reprimidos
		Total	Genes DE*		
GO:0010200/ response to chitin	2.69×10^{-11}	9/67	PUB22, ATL2, ATWRKY53, ATWRKY40, ATPUB29, ATWRKY70, ATL5H, ATSZF2, SCL13	1/0	-2.33/0
GO:0010033/ response to organic substance	9.87×10^{-07}	14/616	POX58, TAR2, ATP5CS, T5L23 , PUB22, ATL2, ER33, ATWRKY53, ATWRKY40, ATPUB29, ATWRKY70, ATL5H, ATSZF2, SCL13	0.71/0.29	-2.38/1.53
GO:0048583/ regulation of response to stimulus	1.51×10^{-4}	5/105	ATWRKY53, AT2G31880, ATWRKY40, ATWRKY70, AtRLP30	1/0	-2.26/0
GO:0031349/ positive regulation of defense response	2.32×10^{-4}	3/25	EVR, ATWRKY70, AtRLP30	1/0	-2.14/0
GO:0050832/ defense response to fungus	2.41×10^{-4}	4/63	PP2C, ATWRKY40, ATWRKY70, ATSZF2	1/0	-2.25/0
GO:0002682/ regulation of immune system process	3.27×10^{-4}	3/28	ATWRKY40, ATWRKY70, AtRLP30	1/0	-2.13/0
GO:0050794/ regulation of cellular process	7.81×10^{-4}	16/1404	TAR2, ATHAP2A , AtRABH1e, MED6, ER33, AtRLP45, ATWRKY53, ATWRKY40, ATWRKY70, AtRLP15, AtRLP14, anac071, AtRLP30, AtRLP21, ATSZF2, SCL13	0.88/0.12	-2.26/1.25
GO:0006955/ response to wounding	9.35×10^{-4}	5/156	PUB22, ATWRKY53, ATWRKY40, ATWRKY70, AtRLP30	1/0	-2.46/0

immune response					
GO:0006950/ response to stress	1.63x10 ⁻³	14/1215	POX58, ATP5CS, PUB22, ATL2, PP2C, ATWRKY53, AT2G31880, ATWRKY40, NB-LRR (AT3G14460), CCR4-NOT, ATWRKY70, NB-LRR (AT3G14470), AtRLP30, ATSZF2	0.86/0.14	-2.23/1.77
GO:0009607/					
response to biotic stimulus	1.68x10 ⁻³	7/359	POX58, PP2C, ATWRKY53, ATWRKY40, CCR4-NOT, ATWRKY70, ATSZF2	0.86/0.14	-2.3/2.09
GO:0044249/					
cellular biosynthetic process	2.11x10 ⁻³	21/2328	TPS21, POX58, ATTPS14, TAR2, ATP5CS, ATHAP2, AATCYSD2, MED6, CAD1, F27L4, MKP11, ER33, ATWRKY53, K16E14, ATWRKY40, ATWRKY70, VHA-A1, F21J9, anac071, ATSZF2, SCL13	0.71/0.29	-2.67/1.89
GO:0009605/					
response to external stimulus	3.31x10 ⁻³	5/208	TAR2, PP2C, ATWRKY40, CCR4-NOT, ATL5H	0.8/0.2	-2.34/1.5
GO:0046246/					
terpene biosynthetic process	3.38x10 ⁻³	2/18	TPS210, ATTPS14	0/1	0/2.4
GO:0023052/signaling					
	3.43x10 ⁻³	9/639	AtRABH1e, AtRLP45, EVR, ATWRKY70, AtRLP15, AtRLP14, ATL5H, AtRLP30, AtRLP21	1/0	-2.22/0
GO:0016567/					
protein ubiquitination	3.67x10 ⁻³	3/64	PUB22, SINA, PUB29	1/0	-2.82/0
GO:0031347/					
regulation of defense response	3.76x10 ⁻³	2/20	ATWRKY53, ATWRKY40	1/0	-2.44/0
GO:0048518/					
positive regulation of biological process	4.59x10 ⁻³	4/139	ATWRKY53, AT2G31880, ATWRKY70, AtRLP30	1/0.25	-2.24/0
GO:0043412/					
macromolecule modification	4.65x10 ⁻³	12/1070	POX58, CRK6, PUB22, TPS21, MKP11, SINA, CCR4-NOT, K16E14, EVR, CCR4-NOT, ATPUB29, F4P9	0.92/0.08	-2.76/2.09
GO:0065007/					
	4.70x10 ⁻³	17/1823	TAR2, ATHAP2A, AtRABH1e, MED6, ER33, AtRLP45, ATWRKY53, EVR, ATWRKY40, ATWRKY70, AtRLP15, AtRLP14, anac071, AtRLP30, AtRLP21,	0.88/0.12	-2.26/1.25

biological regulation			ATSZF2, SCL13		
GO:0002697/					
regulation of immune effector process	4.86x10 ⁻³	1/1	ATWRKY40	1/0	-2.33/0
GO:0016560/					
protein import into peroxisome matrix, docking	4.86x10 ⁻³	1/1	LON2	1/0	-1.97/0
GO:0050691/					
regulation of defense response to virus by host	4.86x10 ⁻³	1/1	ATWRKY40	1/0	-2.33/0

* Os genes demonstrados em negrito estão reprimidos.

* DE – Genes diferencialmente expressos

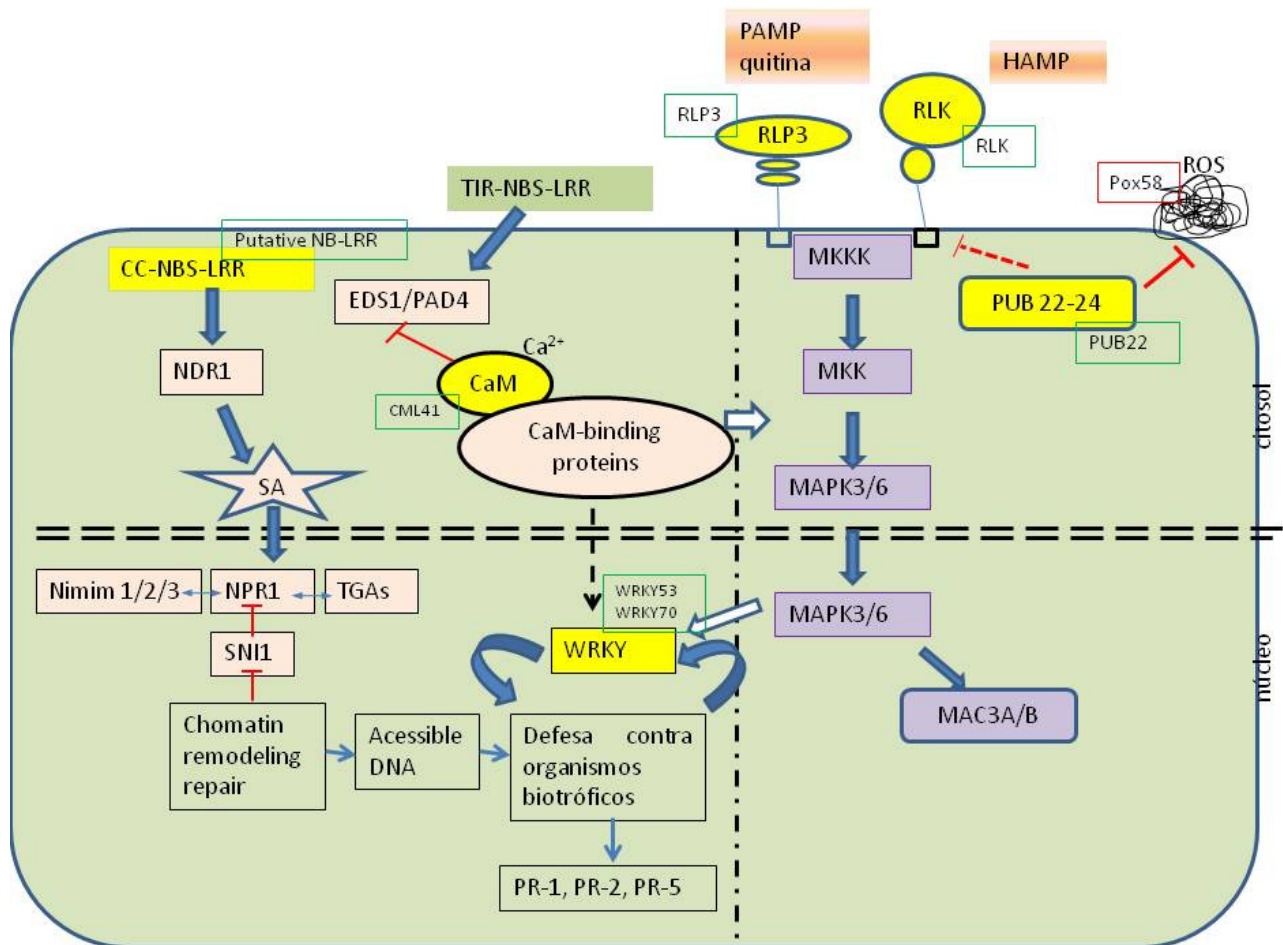


Fig. 9 – Hipótese de ativação da via do SA por reconhecimento de padrões moleculares associados ao ácaro ou ao CiLV-C baseada na expressão diferencial para o efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C de plantas de tanger 'Murcott' em relação à plantas de laranja 'Pêra' 48h após infestação com ácaros virulíferos para o CiLV-C. As setas azuis indicam a ativação de genes, as linhas vermelhas indicam repressão de genes, as setas brancas indicam possível comunicação de vias, as setas pontilhadas indicam processos ainda não completamente estabelecidos. As figuras em amarelo representam genes relevantes para a resistência a leprose dos citros e a identificação deles encontra-se nos retângulos verdes e vermelhos, os verdes indicando genes ativados e o vermelho indicando o gene reprimido. Esta figura foi adaptada de Vlot et al. (2009) e Trujillo et al. (2008).

Para a validação dos dados diferencialmente expressos nas análises de microarranjo por RT-qPCR, foram selecionados genes envolvidos com respostas de defesa, previamente descritos em resposta a outros patógenos: *WRKY 70*, Putative NB-LRR (*NB-LRR*), *Peroxidase 58 (Pox58)*, *WRKY 53*, *Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)*, *CCR 4-not associated factor (CCR4-not)*, *Argonaute (AGO2)*, *Calmodulin-like protein 41 (CML41)*, *ANAC 071* e *Scarecrow-like protein (SCL13)*.

Para dar suporte a teoria de que a ativação da via do SA está envolvida na resistência à leprose dos citros, enriquecemos as análises acrescentando *primers* para *PR-I*, sabidamente relacionado à ativação de SA (Lebel *et al.*, 1998; Vlot *et al.*, 2009) e para *HIN1*, uma vez que a via do SA pode resultar em SAR ou HR e o *HIN 1* está associado ao último (Pontier *et al.*, 1994, 2000; Miao *et al.*, 2010).

6.5.4. Análises de RT-qPCR

6.5.4.1. Teste de genes normalizadores para RT-qPCR

Os valores de Ct do experimento de RT-qPCR foram submetidos ao software GenEx versão 5.0.1.5 (Multi D Analyses AB), o algoritmo geNorm está disponível dentro do software. O geNorm usa o valor chamado de *M-value* para avaliar a estabilidade dos genes na amostra.

Dos quatro pares de *primers* testados os que apresentaram melhor estabilidade foram a ubiquitina e a β -tubulina, conforme a figura 10 e tabela 3.

Embora poucas condições tenham sido testadas para verificar a estabilidade destes genes em relação a leprose dos citros, estes dados foram posteriormente re-analisados em plantas de laranja 'Pera' e tangor 'Murcott' 48h após infestação com ácaros virulíferos e avirulíferos para o CiLV-C no

trabalho de Mafra *et al.* (submetido). Os primers para a ubiquitina e β -tubulina foram considerados adequados para a normalização de qPCRs em resposta ao CiLV-C.

Sendo assim, cada gene teve o resultado da reação de RT-qPCR quantificado pelo Cp, obtido pelo ajuste com a curva sigmoidal, e de acordo com a eficiência de seu par de *primers*, foram então normalizados com os genes β -tubulina e ubiquitina.

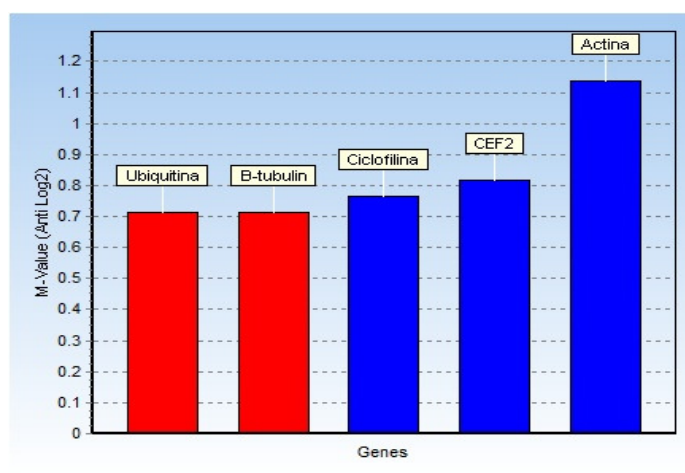


Fig. 10: Gráfico comparando *M-value* dos genes candidatos a normalizadores. As barras de cor vermelha indicam os genes de *M-value* mais baixos; melhores candidatos à normalização.

Tabela 2. Valores de *M-value* dos genes de referência endógena.

Abreviação	Nome do gene	M-Value
<i>TUB</i>	B-tubulin	0,72
<i>UBQ</i>	Ubiquitina	0,72
<i>CYC</i>	Ciclofilina	0,77
<i>ETEF2</i>	eukaryotic translation elongation factor 2	0,82
<i>ACT</i>	Actina	1,14

Além de possibilitar a escolha de normalizadores mais estáveis do que os comumente utilizados, esta análise demonstrou que um dos genes frequentemente utilizados para esse fim no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, a *Actina*, revelou ser o gene mais instável e, desta forma, não adequado para a normalização de experimentos de RT-qPCR.

6.5.4.2. Validação dos dados de microarranjo por RT-qPCR

O experimento de casa de vegetação foi realizado com quatro repetições biológicas de plantas de laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’, submetidas a três tratamentos (CiLV-C + *B. phoenicis*, *B. phoenicis* e controle). Para validação dos genes selecionados por RT-qPCR, foram coletados os seguintes tempos: 6h, 12h, 24h, 48h, 1 semana e no aparecimento de sintomas. Diferenças de expressão com *adjusted pvalue* $\leq 0,1$ foram considerados sugestivos. Os genes escolhidos para validação foram: *WRKY70*, *WRKY53*, *AGO2*, *ANAC71*, NB-LRR putativo, *SCL13*, *P5CS*, *Pox58*, *CCR4-NOT* e *CML41*. Os genes PR-1 e HIN1 foram utilizados para dar suporte a teoria de que a ativação da via do SA resultando numa possível resposta de hipersensibilidade fosse testada. Os *primers* para *PR-1* e *HIN1* estão descritos por Stuart, (2011).

A análise dos dados de RT-qPCR foi realizada, da mesma forma que os dados de microarranjo, por *two-way* ANOVA, considerando-se o efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C de plantas de tangor ‘Murcott’ em relação à plantas de laranja ‘Pêra’ após 48h após infestação com ácaros virulíferos para o CiLV-C. As comparações entre os resultados dos microarranjos e dos RT-qPCRs podem ser verificadas na Tabela 3 e os *primers* utilizados para a validação por RT-qPCRs estão descritos na tabela 4.

Tabela 3: Valores de expressão considerando a interação entre EGA: EV obtida a partir de *two-way* ANOVA e p-valor, comparando os resultados obtidos com as técnicas de microarranjo e RT-qPCR.

ID	Abreviação	Arranjo		RT-PCR tempo real	
		LogFC	Adj.P.Val	LogFC	P.val
CAS-CS-104101	<i>WRKY70</i>	2,2179	0,0823	0,6988	0,0718
CAS-CS-116338	<i>WRKY53</i>	2,5496	0,079	0,488	0,6417
CAS-CS-119954	<i>WRKY40</i>	2,3330	0,0535	0,2775	0,5230
CAS-CR-206253	<i>AGO</i>	1,8028	0,0823	0,2065	0,5712
CAS-CS-103448	<i>ANAC071</i>	1,9844	0,0838	-0,0483	0,9287
CAS-CS-104614	<i>NB-LRR</i> (putative)	1,6929	0,0228	-0,0550	0,8127
CAS-CS-113945	<i>SCL13</i>	1,2706	0,0748	0,0069	0,9756
CAS-CS-108707	<i>P5CSI</i>	-1,4513	0,0649	-0,4368	0,2705
CAS-CS-115051	<i>Pox 58</i>	-2,0883	0,0823	-0,1892	0,4831
CAS-CS-103556	<i>CCR4_NOT</i>	2,4706	0,0698	0,58118	0,2499
CAS-CS-113180	<i>CML41</i>	1,7109	0,0823	0,0027	0,9912

* Os números da coluna ID sonda representam seus códigos na lâmina de microarranjo e em conjunto com as letras são identificadores no banco de dados do CitEST. Os valores em verde demonstram confirmação dos dados.

Tabela 4: Primers utilizados para a validação por RT-qPCR dos experimentos de microarranjo

Pares	Descrição	ID CitEST	ID TAIR	Primers
1	<i>WRKY 70</i>	CAS-CS-104101-F	AT3G56400 <i>e-value</i> = 1×10^{-35}	AAGGAGCTTGTGAAGGGTAAG
		CAS-CS-104101-R		GTACCGAGCACAGAAAGAGTC
2	Putative <i>NBS-LRR</i>	CAS-CS-104614 F	AT3G56400 <i>e-value</i> = 1×10^{-35}	GAGGACAAAAGATTAGGGACCG
		CAS-CS-104614-R		CGGAGAACCAATTCAGTGAGG
3	Peroxidase 58	CAS-CS-115051-F	AT5G06730 <i>e-value</i> = 1×10^{-125}	TCAGGTCAAACCTGCAGAAGG
		CAS-CS-115051-R		ACCCACAACTCTCAACAGC
4	<i>WRKY 53</i>	CAS-CS-116338-F	AT4G23810 <i>e-value</i> = 4×10^{-61}	CCAGAGTCCCCAATATCCATC
		CAS-CS-116338-R		GACCTTCACTTTATCCGTCCTC
5	<i>P5CS</i>	CAS-CS-108707-F	AT2G39800 <i>e-value</i> = 0,0	CTAGGAAAGCACCATACGAGG
		CAS-CS-108707-R		GCCCTCTACATCACTCAACAG
6	<i>CCR 4-not</i>	CAS-CS-103556-F	AT5G22250 <i>e-value</i> = 1×10^{-79}	GATTGACTTTGAGCGCAACAG
		CAS-CS-103556-R		TTAACCAGGTACCCGAAATCG
7	Argonaute	CAS-CR-206253-F	AT3G31280 <i>e-value</i> = 1×10^{-135}	ATGTCTTATGGGATGAGCACG
		CAS-CR-206253-R		CAAGGTCAGCATAGTACACAGG
8	<i>CML 41</i>	CAS-CS-113180-F	AT3G50770 <i>e-value</i> = 2×10^{-37}	AGTCAAAGTCTAGCTCTTCATCG
		CAS-CS-113180-R		TTTCCCATCTCCATCACCATC
9	<i>ANAC 071</i>	CAS-CS-103448-F	AT3G517980 <i>e-value</i> = 2×10^{-24}	ATGGTTCTAGTTGTGGTAGCG
		CAS-CS-103448-R		AGTCTGAAAATCCCTCCGTG
10	<i>SCL13</i>	CAS-CS-113945-F	AT4G17230 <i>e-value</i> = 2×10^{-35}	CCACAAGGTTCTCAGTCGTAC
		CAS-CS-113945-R		GTTTGTTCCTCAGTTCGTTGC
11	<i>WRKY 40</i>	CAS-CS-119954-F	AT4G80840 <i>e-value</i> = 1×10^{-47}	CCGAACCGCCGTCACACAA
		CAS-CS-119954-R		AGCGACTTACCAAGGGGAGCACA

Dados provenientes de microarranjo analisados por *two-way* ANOVA dos experimentos de casa de vegetação resultaram, para o efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C de plantas de tangor ‘Murcott’ em relação à plantas de laranja ‘Pêra’ após 48h após infestação com ácaros virulíferos para o CiLV-C, em três genes da família *WRKY* diferencialmente expressos: a *WRKY40*, *WRKY53* e a *WRKY70*.

Foi demonstrado que vários genes da família *WRKY* estão intimamente envolvidos com as alterações na expressão de genes em resposta aos patógenos (Chen e Chen, 2000; Yoda *et al.*, 2002; Kalde *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2003), atuando como reguladores positivos ou negativos da resposta de defesa induzida tanto por PAMP quanto por efetores (Eulgem e Somssich, 2007).

O *WRKY70* encontrado mais expresso em plantas resistentes ao CiLV-C entre 1h e 48h após infestação com ácaros apresentou similaridade com a *WRKY70* de *A. thaliana*, sendo que sua maior expressão durante o *time course* ocorre em 1h e sua menor expressão ocorre após o aparecimento de sintomas no genótipo suscetível (tabela 5). Em *Arabidopsis*, alguns trabalhos demonstraram que o *WRKY70* determina o balanço entre as vias de defesa dependentes de ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), e é ainda requisitado para a resistência mediada por genes R (Li *et al.*, 2006; Knoth *et al.*, 2007). Em tecidos de *A. thaliana* a expressão da *WRKY70* pode ser aumentada na presença de patógenos e seu acúmulo pode ser limitado pela *NPR-1* (*Nonexpresser of Pathogenesis-Related genes* 1). Nos trabalhos de Li *et al.* (2004) e (2006) foi demonstrado que o *WRKY70* confere resistência basal contra o fungo biotrófico *Erysiphe chicoracearum*, mas reprime a defesa contra fungos e bactérias necrotróficas como *Alternaria brassicicola* e *Erwinia carotovora*. Contrariando esses dados, foi demonstrado que infecções com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* aumentam a expressão de *WRKY70* (AbuQuamar *et al.*, 2006). O efeito diferencial na expressão da *WRKY53* foi encontrado aumentado 1h após a infestação com ácaros e aparentemente teve sua expressão reprimida com o tempo (tabela 5), apresentando o menor valor no *time course* após o aparecimento de sintomas no

genótipo suscetível. Esse padrão de expressão também foi observado na *WRKY70*, podendo sugerir que elas hajam de maneira interligada na resposta ao CiLV-C. Este gene parece estar relacionado com a senescência foliar (Hinderhofer e Zentgraf, 2001; Miao *et al.*, 2004) e complementando esta afirmação, a *WRKY53* pode ser induzida pelo peróxido de hidrogênio, que tem seus níveis aumentados durante a senescência (Miao *et al.*, 2004). No trabalho de Dong *et al.* (2003), foi demonstrado que embora a *WRKY53* fosse induzida pelo SA, a infecção de patógenos alterava apenas levemente sua expressão. A expressão destes genes é antagonicamente regulada em resposta à JA e SA, sugerindo que a *WRKY53* e o *epithiospecifying senescence regulator* (ESR) mediam a comunicação negativa entre resistência à patógenos e senescência em *A. thaliana* (Miao e Zentgraf, 2007). Li *et al.* (2004) demonstraram que a expressão da *WRKY70* pode ser alterada pela *WRKY53* e vice-versa, este fato justifica perfeitamente a expressão similar destes dois genes.

A *WRKY40*, ao contrário dos demais fatores de transcrição *WRKY* encontrados neste trabalho, demonstrou maior expressão em 6h e 12h (tabela 5). Ainda não estão disponíveis muitas informações sobre este gene, mas sabe-se que ele teve sua expressão aumentada em mutantes de *Arabidopsis* transformados com o *RYC* (*coiled coil nucleotide binding site leucine rich repeat-type resistance gene*), que confere resistência do tipo hipersensibilidade contra uma linhagem de *Cucumber mosaic virus* (CMV-Sekine *et al.*, 2008).

Tabela 5: Diferença de expressão em logFC encontrada *por two-way* ANOVA levando-se em consideração EGA: EV por RT-qPCR.

		1h	6h	12h	24h	48h	1 semana	Sintomas
WRKY70	LogFC	1,62	0,39	-0,1	0,35	0,7	-0,52	-1,64
	P.Val	0,005	0,46	0,86	0,37	0,071	0,014	0,0004
WRKY53	LogFC	2,51	1,07	-0,41	0,53	0,49	-1,33	-1,38
	P.Val	0,011	0,14	0,64	0,62	0,64	0,044	0,018
WRKY40	LogFC	0,76	0,84	1,70	-0,26	0,28	0,32	NA
	P.Val	0,22	0,032	0,03	0,58	0,52	0,6	NA
AGO	LogFC	1,016	0,23	0,6	-0,2	-0,21	-0,43	0,09
	P.Val	0,006	0,14	0,26	0,65	0,57	0,019	0,62
ANAC71	LogFC	1,6	0,06	-0,58	0,12	-0,048	-0,61	-0,92
	P.Val	0,0001	0,9	0,45	0,81	0,93	0,0009	0,0015
CML41	LogFC	NA	NA	0,5	0,12	0,003	-0,21	-0,5
	P.Val	NA	NA	0,15	0,78	0,99	0,32	0,04
Prx58	LogFC	0,88	-0,24	0,45	-0,36	-0,19	0,46	0,34
	P.Val	0,04	0,42	0,34	0,47	0,49	0,12	0,07
P5CS	LogFC	0,54	-0,048	0,7	-0,46	-0,44	0,075	-0,04
	P.Val	0,09	0,85	0,03	0,37	0,27	0,78	0,92
CCR4-NOT	LogFC	2,098	0,44	-0,11	0,44	0,58	-0,16	-0,44
	P.Val	0,001	0,46	0,9	0,41	0,25	0,72	0,18
NB-LRR	LogFC	0,009	0,23	0,57	0,36	-0,06	-0,13	-0,14
	P.Val	0,99	0,19	0,19	0,31	0,81	0,6	0,34
PR-1	LogFC	-0,15	-0,43	0,36	0,1	0,92	0,05	0,1
	P.Val	0,77	0,33	0,47	0,91	0,08	0,87	0,77
HINI	LogFC	0,68	-0,06	-0,26	-0,19	1,66	-0,45	-0,94
	P.Val	0,21	0,88	0,56	0,74	1,25 x 10 ⁻⁵	0,08	0,02

* As células destacadas em verde mostram os valores de diferença de expressão com $p\text{-value} \leq 0,1$ ou seja, significativos nesta comparação

Os Argonautas são proteínas que estão envolvidas em mecanismos de silenciamento de RNA. O silenciamento de RNAs é um fenômeno geral em eucariotos e tem papel importante em vários processos biológicos como regulação de desenvolvimento, defesa antiviral e remodelamento de cromatina. A análise de interação EGA:EV por *two-way* ANOVA demonstrou que o aumento de expressão do *AGO2* em 1 h é significativo. No entanto, nos tempos posteriores a esse, parece haver uma diminuição na sua expressão no genótipo resistente (tabela 5). Dessa forma, poder-se-ia sugerir que o *AGO2* não seria responsável pelo silenciamento viral, tornando a planta resistente, mas sim,

atuando como mecanismo de silenciamento nas áreas adjacentes à infecção, tornando-a mais lenta e impedindo o vírus de alcançar o floema. É importante atentar ao fato de que segundo o trabalho de Harvey *et al.* (2011), a defesa mediada por RNAs ocorre em uma sequência. Quando a primeira barreira, no caso o *AGO1*, é superada pelo vírus, uma segunda barreira (*AGO2*) limita a colonização do patógeno. Para verificar se isso ocorreria neste experimento, foi realizada uma nova busca pelo *AGO1* nos dados gerados pelo microarranjo. Embora não tenha sido possível encontrar uma expressão diferencial deste gene, é necessário lembrar que a análise de microarranjo foi realizada em apenas um ponto do *time course*.

Por outro lado, mutantes de *Arabidopsis* hipomórficos para *AGO2* apresentaram maior quantidade de sintomas e maior severidade após infecção com *Turnip crinkle virus* (TCV) and CMV, mas o acúmulo de partículas virais sofreu alteração pequena e transiente (Harvey *et al.*, 2011). O *AGO2* está classificado filogeneticamente na mesma clade do *AGO7*, mas ao contrário do último que está envolvido na biogênese de *tasi-RNA*, os mutantes de *AGO2* não apresentam fenótipo óbvio (Vaucheret, 2008). Este fato pode indicar que o *AGO2* evoluiu e se especializou em defesa anti-viral (Jaubert *et al.*, 2011). A *AGO2* foi encontrada significativamente induzida em *Arabidopsis* após infecção com TCV e CMV (Harvey *et al.*, 2011), mas diferindo da análise realizada neste trabalho, em que a indução ocorreu 1h após a infestação das plantas com ácaros virulíferos, o aumento da expressão de *AGO2* foi relatada em 7 e 14 dias após inoculação.

Em conjunto com os demais dados obtidos neste trabalho, é possível dizer que as respostas relacionadas à resistência ao CiLV-C são diferentes às causadas pela maioria dos vírus. Ainda são necessários mais estudos para se obter o papel exato da *AGO2* nessa resistência, uma vez que sua resposta é mais inicial para este patossistema do que para outros vírus e que embora as plantas de tangor ‘Murcott’ não apresentem sintomas da doença, seja possível detectar o vírus nelas.

O gene *ANAC71* encontrado diferencialmente expresso considerando-se a interação do CiLV-C, ácaro e genótipo teve sua maior expressão 1 h após infestação e sua expressão parece diminuir progressivamente durante o *time course* (tabela 5). Uma proteína com domínio *NAC* de tomate chamada *SINAC1* que interage com um *replication-enhancer* de geminivirus (REn), foi identificada e pode ter um papel na replicação viral (Selth *et al.*, 2005). Outros membros da família *NAC*, que funcionam no desenvolvimento e na replicação viral (Xie *et al.*, 2000; Hegedus *et al.*, 2003) interagem com outras proteínas de geminivírus como a *RepA*, inibindo a replicação viral (Xie *et al.*, 1999). Além disso, a interação de proteínas *NAC* com a capa proteica de vírus de RNA é necessária para a resposta de resistência em *A. thaliana* (Ren *et al.*, 2000). Não se sabe exatamente a função do *ANAC71* em relação ao CiLV-C, caso realmente exista uma interação dessa proteína com a capa proteica viral como o descrito para *A. thaliana*, poder-se-ia sugerir que ocorra um reconhecimento precoce do patógeno, desencadeando uma resposta de defesa eficiente.

Nas análises da interação EGA:EV de microarranjo por *two-way* ANOVA, foi encontrada uma calmodulina *CML41* diferencialmente expressa no tempo de 48h (tabela 5). No entanto, após a realização de RT-qPCRs para a validação destes dados, pôde-se observar que embora este gene siga a mesma tendência de expressão no *time course*, aparentemente, o tempo em que a diferença de expressão encontra-se significativa utilizando-se a mesma análise de interpretação dos microarranjos é durante o aparecimento de sintomas, quando este gene aparece reprimido no genótipo resistente.

Existem algumas hipóteses possíveis, a primeira é que em uma análise individual das amostras analisadas considerando-se Pa, Pv, Ma e Mv, a expressão precoce em Mv, que ocorre em 1h com valor de logFC de 0,8 (Figura 10) pode sugerir que ocorra uma sinalização de imunidade inata que envolve o aumento do Ca^{2+} citosólico e a geração de óxido nítrico, o que leva à resposta de hipersensibilidade a patógenos avirulentos (Lecourieux *et al.*, 2006). Lecourieux *et al.* (2006) e Ali *et al.* (2007) estabeleceram uma conexão entre a elevação do Ca^{2+} citosólico e a síntese de óxido nítrico

(NO) durante a resposta imune inata. Desta forma, no genótipo resistente seria formada uma resposta de hipersensibilidade impedindo a colonização do vírus, uma vez que não são observados sintomas nesse genótipo, pode-se sugerir que as lesões sejam tão pequenas que não podem ser observadas a olho nu. O trabalho de Freitas-Astúa et al. (2007) realizou um estudo baseado em bibliotecas de EST analisando a resposta de plantas de laranja 'Pêra' ao CiLV-C 48h após infestação com ácaros virulíferos. Os resultados obtidos sugerem que respostas de HR não estejam relacionadas com o genótipo suscetível ao patógeno. Entretanto, considerando-se que a análise foi realizada em apenas um ponto de *time course*, poder-se-ia assumir que a HR ocorre em tempos posteriores ao proposto e que a análise de respostas de defesa em um único ponto de coleta forneça dados insuficientes para uma compreensão do modo de resposta de plantas ao vírus. Uma segunda hipótese é que a sinalização ocorra nos dois genótipos, mas como a sinalização em tangor 'Murcott' ocorre antes, ele é capaz de isolar o vírus de uma maneira mais eficiente. Outra hipótese é que, seguindo a teoria de Denoux et al. (2008), este gene tem um papel no amortecimento da resposta imune no genótipo suscetível, ou seja, que seu aumento de expressão ocorre quando a maioria dos genes relacionados a defesa estão voltando ao seu nível basal, fato que poderia ser observado pela expressão claramente elevada em relação ao genótipo resistente a partir de 12h.

A peroxidase foi encontrada reprimida nas análises de microarranjo com coleta realizada em 48h. No entanto, em RT-qPCR, sua expressão só parece ser relevante após o aparecimento de sintomas (tabela 5). Como as peroxidases estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, torna-se difícil encontrar sua função exata no patossistema da leprose dos citros. No trabalho de Gechev *et al.* (2004), a peroxidase 58 (ortóloga à encontrada em citros) aparece diferencialmente expressa em uma análise de microarranjo para avaliar a morte celular induzida pela toxina AAL em *A. thaliana*.

CML41

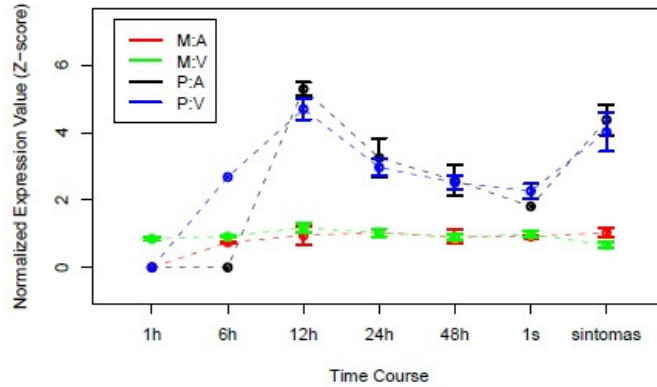


Fig 10: Perfil de expressão da *CML41* por RT-qPCR. Resultados analisados independentemente e relativos a amostras sadias.

A *P5CS* foi considerada estatisticamente relevante na análise de microarranjo para o efeito diferencial causado pela infecção do vírus comparando-se os genótipos de laranja ‘Pêra’ e tangor ‘Murcott’ apresentando logFC de -1,45 no genótipo resistente infectado com o CiLV-C. Na validação destes dados durante o *time course*, o gene é encontrado mais expresso considerando-se a interação EGA:EV em 1h e 12h (tabela 5). A *P5CS* está envolvida na via do glutamato, sendo essencial para a biossíntese da prolina. Fabro et al. (2004) descreveram que o acúmulo de prolina livre aumenta em tecidos em que HR está ativada em resposta à infecção de *Pseudomonas syringae* avirulenta para *A. thaliana*. Utilizando a mesma hipótese da *CML41*, poder-se-ia relacionar o efeito precoce da *P5CS* com o confinamento do vírus em HR microscópicas no genótipo resistente. Deduz-se que as lesões sejam microscópicas uma vez que o genótipo não apresenta sintomas.

A *CCR4-NOT* demonstrou expressão diferencial relacionada à resistência aumentada no tempo 1h (tabela 5). Em *Drosophila melanogaster*, a *Ago1* interage diretamente com o *GW182*, uma proteína com um domínio de ligação de RNA que recruta o complexo *CCR4-NOT* para o mRNA (Behm-Ansmant et al., 2006). Além disso, Marathe et al. (2004) encontraram uma *CCR4-NOT* na resposta de *A. thaliana* ao CMV. Caso o *CCR4-NOT* esteja relacionado à atividade de *AGO1*, é

possível que sua expressão precoce no genótipo resistente exposto ao vírus esteja relacionada ao silenciamento viral.

A *NB-LRR* encontrada diferencialmente expressa nos dados de microarranjo para a interação EGA:EV com logFC de 1,69, não parece ter relevância na resistência contra o CiLV-C quando analisada por RT-qPCR (tabela 5). Não foi encontrada diferença estatística nas comparações realizadas para nenhum dos tempos do *time course*. Deve-se lembrar, entretanto, que nos experimentos biológicos envolvendo o CiLV-C, não é possível assegurar que os ácaros inoculem as plantas com o vírus ao mesmo tempo, acarretando em diferenças na expressão de genes envolvidos em respostas de defesa entre repetições biológicas, o que pode causar a ausência de diferença estatística na análise supracitada. Analisando-se individualmente os dados de Pa, Pv, Ma e Mv normalizados com as plantas sadias (figura 10), no entanto, foi encontrada uma clara diferença de expressão entre plantas dos genótipos resistente e suscetível. As plantas resistentes parecem simplesmente não perceber o estímulo externo, mantendo o mesmo padrão de expressão em todos os tempos, independentemente do tratamento. Já o genótipo suscetível tem sua expressão bem aumentada em relação ao resistente e ainda apresenta algumas variações em relação ao estímulo. Neste caso, a expressão deste gene pode estar relacionada ao genótipo suscetível, ou ainda, a falta de expressão e variação na expressão deste gene no genótipo resistente poderia estar associada ao não desenvolvimento de sintomas, ou seja, o aumento de expressão desta NB-LRR poderia estar ligado a manifestação da doença.

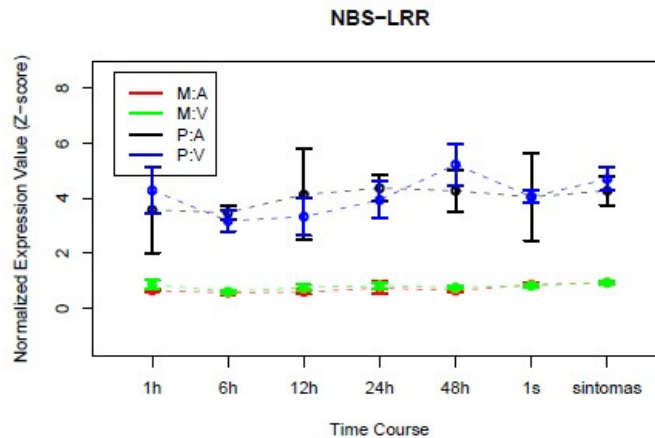


Fig 10: Perfil de expressão da *NB-LRR* por RT-qPCR. Resultados analisados independentemente e normalizados com amostras sadias.

A indução da *scarecrow-like protein (SCL13)* 1h após a infestação com ácaros foi considerada relevante na resistência ao CiLV-C considerando-se os resultados de expressão da interação EGA:EV estimados por *two-way* ANOVA (tabela 5). A *SCL13* é um fator de transcrição e sua função ainda não é completamente conhecida. Embora poucas informações sobre este fator de transcrição ainda sejam raras, ele foi utilizado em uma publicação de aplicação de patente da BASF por Allen et al. (2010).

De acordo com os genes validados neste trabalho, pode-se perceber o claro envolvimento da via do ácido salicílico com as respostas de defesa de plantas cítricas ao CiLV-C.

A *PR-1* é positivamente regulada pelo ácido salicílico e quando testada, demonstrou-se diferencialmente expressa no tempo de 48h (tabela 5), embora a diferença de expressão da interação EGA:EV seja de apenas logFC 0,92, poderia-se considerar que de forma complementar aos demais dados encontrados neste trabalho, existem fortes indícios de que a via do SA seja responsável por parte pela resistência de plantas a leprose.

A via do SA pode estar relacionada de maneira geral em duas formas de resistência molecular, o SAR e o HR (Kunkel e Brooks, 2002). De forma a verificar se o HR poderia estar associado à resistência de plantas a leprose, isolando o vírus em regiões tão restritas que não seriam observadas a olho nu, uma vez que não são observados em plantas de tangor 'Murcott', testamos ainda o *HIN1*, um marcador utilizado comumente para reação de HR (tabela 5).

Como pode-se observar na tabela 5, a maior expressão do *HIN1* ocorre em 48h com LogFC estimado para a interação EGA:EV de 1,66 no genótipo resistente infestado com ácaros virulíferos para CiLV-C, enquanto baixa para logFC -0,46 em 1 semana e logFC -0,94. O *HIN1* é considerado um marcador clássico de hipersensibilidade. O fato da *HIN1* ter sido expressa em 48h e depois reprimida nos tempos seguintes precisa ser mais estudado para que se possa verificar em que momento e de que forma a da reação de HR acontece.

Os valores relativamente baixos de expressão de genes relacionados a defesa podem ter ocorrido pelo fato de que as folhas infestadas com ácaros foram coletadas inteiras, pela impossibilidade de se prever os locais onde o ácaro se alimentou. Caso a resposta ao vírus ocorra unicamente de maneira localizada, é possível que o resultado obtido nesta análise esteja diluído diminuindo consequentemente os valores de expressão.

6.6. Considerações finais

O experimento para a avaliação de respostas de defesa de laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ em resposta ao CiLV-C foi criteriosamente realizado, de forma a se almejar encontrar genes diferencialmente expressos em um tempo inicial da infecção. A coleta do material vegetal 48h horas após a infestação com ácaros foi realizada de forma a encontrar genes associados à defesa e não a possíveis alterações fisiológicas acarretadas pela leprose dos citros.

A análise de *two-way* ANOVA permitiu uma abordagem diferente da utilizada de maneira geral na avaliação de respostas de defesa. Uma vez que a leprose dos citros envolve um patossistema complexo, que ainda não permite a inoculação do vírus na planta sem que haja a injúria de alimentação do ácaro, foi necessário encontrar um modelo matemático que se adequasse a estas condições. Esse modelo permitiu a visualização de genes diferencialmente expressos considerando a interação entre genótipo e infecção pelo CiLV-C, resultando em genes intimamente ligados a respostas de defesa.

Estudos realizados anteriormente em resposta a leprose dos citros avaliaram a interação do genótipo suscetível à doença, sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho podem ser de extrema importância para a compreensão do patossistema.

Esses resultados sugerem a participação de receptores *RLK* e *RLP*, que podem estar relacionados ao reconhecimento do ácaro ou do vírus. Duas possibilidades distintas podem ser consideradas, a primeira, como neste patossistema a inoculação do vírus está obrigatoriamente associada à alimentação do ácaro, é que ou a quitina do ácaro ou sua saliva sejam reconhecidos como padrões moleculares associados à patógenos ou herbivoria, disparando a vias de sinalização que resultam em SAR. Por outro lado, deve-se atentar ao fato de que embora a tangor ‘Murcott’ não apresente sintomas da doença, partículas virais já foram detectadas em suas folhas. Além disso,

poder-se-ia dizer que ocorre um reconhecimento do vírus que dispara respostas ao ácaro devido à uma co-evolução gênica em resposta ao vírus e seu vetor.

Além dos receptores encontrados diferencialmente expressos, foi possível identificar a *CML41*. O relacionamento deste gene com as assinaturas de cálcio sugere um reconhecimento diferencial destas, associados à resistência. Embora não se saiba exatamente o mecanismo que levam ao não desenvolvimento de sintomas, pela expressão de genes como *WRKY70* e *WRKY53*, pode-se sugerir que exista ativação da via do ácido salicílico associada à resposta de defesa a organismos biotróficos.

Inesperadamente, o gene *AttPS14* foi encontrado reprimido em resposta à interação EGA:EV. Este gene está associado à produção de compostos voláteis que possibilitam a interação de curta e longa distância entre plantas e organismos benéficos ou prejudiciais (Raguso et al., 2004). Estes compostos voláteis fazem parte da família dos terpenos e já foram encontradas em resposta a herbivoria e em alguns casos com a associação de mais alguns componentes, foram relacionados à atração de ácaros predadores (Kappers et al., 2005).

Aparentemente não existe diferença de colonização de plantas de laranja ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’ por ácaros *B. phoenicis*, entretanto, serão necessários mais estudos como o intuito de se verificar se a repressão do *AttPS14* poderia indicar que em campo, um número menor de ácaros vetores seria atraído pelo genótipo resistente.

Um argonauta *AGO2* relacionado ao silenciamento viral foi encontrado nestas análises, mas sua expressão no *time course* demonstra que são necessários novos estudos para se estabelecer a relação correta deste gene ao possível silenciamento do CiLV-C.

Com este trabalho, foram encontrados vários indicativos de mecanismos de resistência possivelmente associados à leprose dos citros. Estes resultados precisam ainda ser melhor explorados e novos experimentos precisam ser estabelecidos com o intuito de se esclarecer a forma exata de atividade destes genes.

A avaliação massal de dados fornecidos pelos microarranjos deve ser tomada como primeiro passo para a compreensão deste patossistema complexo. Deve-se atentar ao fato de que experimentos como este não podem ser considerados o fim do trabalho e sim o início, fornecendo indicações para novos trabalhos mais específicos. Como o teste de aplicação exógena de ácido salicílico em plantas suscetíveis infestadas com ácaros virulíferos para o CiLV-C com o intuito de observar aumento de resistência; testes de superexpressão e repressão das *WRKYS 40, 53 e 70* na planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia, sabidamente suscetível à leprose dos citros, para a verificar se após a infecção com *B. phoenicis* virulíferos para CiLV-C existe alteração na expressão de sintomas e verificação em campo se o aumento de expressão do gene *AttPS14* em plantas de tangor ‘Murcott’ em relação à plantas de laranja ‘Pera’ influenciam na colonização de ácaros *B. phoenicis* ou ácaros predadores.

6.7. Conclusão

A análise dos dados de microarranjo provenientes do um patossistema leprose dos citros, demanda uma análise que possa comportar as diferentes variáveis existentes. Esta questão foi resolvida como a utilização da *two-way* ANOVA e estimação do efeito da interação entre o efeito do genótipo das plantas e injúria por alimentação do ácaro e o efeito da infecção por CiLV-C de plantas de tangor ‘Murcott’ em relação à plantas de laranja ‘Pêra’ após 48h após infestação com ácaros virulíferos para o CiLV-C. Com o resultado desta análise foi possível verificar a expressão de genes relacionados à resistência a leprose dos citros.

Alguns dos dados obtidos neste trabalho são inéditos para este patossistema, como por exemplo, a indicação de que o patógeno seja reconhecido por padrões moleculares associados ao vírus ou ao ácaro.

Existe ainda a hipótese de que a resposta de defesa ao CiLV-C seja ativada a partir do reconhecimento do ácaro, uma vez que as respostas diferenciais em relação aos genes encontrados neste trabalho ocorreram a partir de 1h após infestação com ácaros, demonstrando que a resposta ao vírus pode ser muito mais inicial do que era esperado ou que a defesa ao vírus ocorra a partir do reconhecimento da injúria causada pela alimentação do ácaro.

O contrário também poderia ocorrer, sendo que a planta reconheceria o vírus da leprose e resultaria em um reconhecimento do ácaro vetor no genótipo resistente, fato que poderia ocorrer devido a uma co-evolução gênica em resposta a vírus e vetores artrópodos.

Atualmente, sabem-se os vírus vegetais engatilham diversas vias de defesa no hospedeiro e não uma única. Desta forma, observou-se que a via de resposta de defesa ativada em resposta ao vírus é a do ácido salicílico e além dela, foi identificado o *AGO2*, que apresenta relevância no silenciamento gênico de outros vírus vegetais.

A repressão do gene *AttPSI4* associado a resistência das plantas à leprose dos citros pode estar envolvida com a atração de ácaros vetores ou predadores, esta informação requer mais estudos para a elaboração de uma teoria..

Com estes resultados, é possível inferir que a resistência à leprose dos citros deve envolver diferentes mecanismos como o silenciamento viral, ativação de SAR, HR e ainda atração de predadores do vetor.

7. PRODUÇÃO NO PERÍODO

7.1. Artigos completos publicados

-Boava, L.; Cristofani-Yaly, M.; Mafra, V.S.; Kubo, K.S.; Kishi, L.; Takita, M.A.; Machado, M.A. (2011). Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. BMC Genomics, 12(39). doi:10.1186/1471-2164-12-39.

-Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Bastianel, M.; Antonioli-Luizon, R.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. (2011). Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. Exp. Appl. Acarol., 54:33–39.

- Bastianel, M.; Novelli, V.M.; Kitajima, E.W.; Kubo, K.S.; Bassanezi, R.B.; Machado, M.A. e Freitas-Astúa, J. (2010) Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite Virus Pathosystem. Plant Dis., 94:284–292.

Rodriguez, V.; Bastianel, M.; Kubo, K.S.; Fadel, A.L.; Nicolini, F.; Novelli, V.; Freitas-Astúa, J. (2007) Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. Laranja, 28: 29-38.

7.2. Artigos submetidos

- Mafra, V.S.; Kubo, K.S.; Alves-Ferreira, M.; Ribeiro-Alves, M.; Stuart, R.M; Boava, L.P.; Rodrigues, C.M.; Machado, M.A. Selection and validation of reference genes for accurate transcript normalization in citrus species under different experimental conditions – Submetido à revista PlosOne em 07/09/2011

7.3. Resumos apresentados em Congressos

- Mauricio, F.N.; Kubo, K.S.; Cristofani-Yaly, M.; Boava, L.P.; Bastianel, M.; Freitas-Astúa, J.; Machado, M.A. . Avaliação da expressão gênica diferencial em híbridos para resistência a leprose dos citros. In: Congresso paulista de Fitopatologia, 2011, Campinas, Summa Phytopathologica, 2011.
- Kubo, K.S.; Arena, G.D.; Kitajima, E.W.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. Transmission of Citrus leprosis C virus (CiLV-C) to *Arabidopsis thaliana* by *Brevipalpus phoenicis* mites. In: XVIII Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologists, 2010, Campinas. IOCV Abstracts, 2010.
- Kubo, K.S.; Mafra, V.S.; Stuart, R.M.; Alves, M.R.; Cristofani-Yaly, M.; Kishi, L.; Costa, F.M.; Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Machado, M.A. Microarray analysis of the response of Murcott tangor and 'Pera' sweet orange to Citrus leprosis virus. In: Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá, Anais do Congresso Brasileiro de Genética, 2010.
- Boava, L.P.; Cristofani-Yaly, M.; Mafra, V.M., Kubo, K.S.; Stuart, R.M. e Machado, M.A. Gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica* using Real-time quantitative PCR. In: OzBio, 2010, Melbourne, OzBio Posters Abstracts, 2010, p.146.
- Kubo, K.S.; Cristofani-Yaly, M.; Ribeiro-Alves, M.; Boava, L.P.; Costa, F.M.; Kishi, L.; Mafra, V.S.; Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Machado, M.A. Genome-wide transcriptome analysis of citrus hybrids plants resistant or susceptible to Citrus leprosis virus C (CiLV-C). In: OzBio, 2010, Melbourne, OzBio Posters Abstracts, 2010, p.154.
- Kubo, K.S.; Stuart, R.M.; Bastianel, M.; Costa, F.M.; Freitas-Astúa, J.; Machado, M.A. . Response of Murcott tangor and 'Pera' sweet orange to Citrus leprosis virus C (CiLV-C) and *Brevipalpus phoenicis*

mites analyzed by 2DE. In: Plant Biology, 2009, Honolulu. Final Program and abstract supplement. v. 2009. p. 335-335.

Costa, F.M.; Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Locali-Fabris, E.C.; Kubo, K.S.; Gondim Júnior, M.G.C.; Novelli, V.M.; Pereira, J.A. Detecção do vírus da mancha anelar do cafeeiro (CoRSV) nas diferentes fases do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, Rio de Janeiro. Tropical Plant Pathology, 2009. v. 34. p. 272-272.

Nicolini, F.; Bastianel, M.; Schons, J.; Kitajima, E. W.; Locali, E.C.; Pereira, J.A.; Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Machado, M.A.; Fernandez, R. Comparação entre os títulos de vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* por RT-qPCR. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2008, Salvador. Tropical Plant Pathology, 2008. v. 33. p. 287-287. Bastianel, M.; Freitas-Astúa, J.; Nicolini, F.; Cristofani-Yaly, M.; Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Machado, M.A. Differential Gene Response of citrus to CiLV. In: 11 th International Citrus Congress, 2008, Wuhan. Program and Abstract of 11th International Citrus Congress, 2008. v. 11. p. 64-64.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbuQamar, S.; Chen, X.; Dhawan, R.; Bluhm, B.; Salmeron, J.; Lam, S.; Dietrich, R.A.; Mengiste, T. (2006) Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *Plant J.*, 48: 28–44.
- Adams, A.; Farkas, T.; Somlayai, G.; Hevesi, M.; Kiraly, Z. (1989) Consequence of O₂ generation during bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 34: 13–26.
- Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merrill, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F. *et al.* (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013): 1651-1656.
- Alexa, A.; Rahnenfuhrer, J., Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics*, 22(13):1600–1607.
- Ali, R.; Ma, W.; Lemtiri-Chlieh, F.; Tsaltas, D.; Leng, Q.; Von Bodman, S.; Berkowitz, G.A. (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell*, 19: 1081–1095.
- Alvarez, M.E.; Pennell, R.I.; Meijer, P.J.; Ishikawa, A.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92: 773–784.
- Anaya-López, J.L.; Pérez-Mora, E.; Torres-Pacheco, I.; Muñoz-Sánchez, C.I.; Guevara-Olivera, L.; González-Chavira, M.; Ochoa-Alejo, N.; Rivera- Bustamante, R.F.; Guevara-González, R.G. (2005) Inducible gene expression by *Pepper huasteco virus* in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. *Can. J. Plant Pathol.*, 27: 276–282.
- Andersson, A.; Keskitalo, J.; Sjödin, A.; Bhalerao, R.; Sterky, F.; Wissel, K.; Tandre, K.; Aspeborg, H.; Moyle, R.; Ohmiya, Y.; Bhalerao, R.; Brunner, A.; Gustafsson, P.; Karlsson, J.; Lundeberg, J.; Nilsson, O.; Sandberg, G.; Strauss, S.; Sundberg, B.; Uhlen, M.; Jansson, S.; Nilsson, P. (2004). A transcriptional timetable of autumn senescence. *Genome Biol.*, 5(4): R24.
- Arimura, G.; Maffei, M.E. (2010) Calcium and secondary CPK signaling in plants in response to herbivore attack. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 400: 455–460.

- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.*, 141: 391–396.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gómez, L., Boller, T., Ausubel, F.M.; Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977–983.
- Ascencio-Ibáñez, J.T.; Sozzani, R.; Lee, T.J.; Chu, T.M.; Wolfinger, R.D.; Cella, R.; Hanley-Bowdoin, L. (2008). Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol.*, 148: 436–454.
- Bari, R.; Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.*, 69:473–488.
- BASF Corporation – *Scarecrow-like* stress related polypeptides and methods of use in plants – Allen, D.; Mills, L.V.; van Thielen, N.; Silva, O.C. – United States Patent Application Publication, US2010/0005542A1, 07-01-2010.
- Bassanezi, R.B.; Laranjeira, F.F. (2007). Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. *Plant. Pathol.*, 56:97-106.
- Bassanezi, R.B.; Spósito, M.B.; Yakamoto, P.T. (2002). Adeus à leprose. *Revista Cultivar*, 10 ed.
- Bastianel, M.; Cristofani-Yaly, M.; Oliveira, A.C.; Freitas-Astúa, J.; Garcia, A.A.F.; Resende, M.D.V.; Rodrigues, V.; Machado, M.A. (2009). Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. *Euphytica*, 169:101–111.
- Bastianel, M.; Freitas-Astúa, J.; Nicolini, F.; Segatti, N.; Novelli, V.M.; Rodrigues, V.; Medina, C.L.; Machado, M.A. (2008) Response of mandarin cultivars and hybrids to Citrus leprosis virus. *J. Plant Pathol.*, 90: 305-310.
- Bastianel, M.; Freitas-Astua, J.; Rodrigues, V.; Arrivabem, F.; Antonioli-Luizon, R.; Machado, M.A. (2004). Resposta do tangor Murcott à inoculação do vírus da leprose dos citros a campo e em casa de vegetação. *Laranja*, 25: 337-348.
- Bastianel, M.; Novelli, V.M.; Kitajima, E.W.; Kubo, K.S.; Bassanezi, R.B.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. (2010) Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite Virus Pathosystem. *Plant Dis.*, 94:284–292.

- Beckers, G.J.M.; Spoel, S.H. (2006). Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biol.*, 8: 1–10.
- Behm-Ansmant, I.; Rehwinkel, J.; Doerks, T.; Stark, A.; Bork, P.; Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4-NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.*, 20, 1885–1898.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc.: Series B (Methodological)*, 57 (1): 289-300.
- Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363–366.
- Bitancourt, A. A. (1934). Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. *Arq. Inst. Biol.*, 5:185- 196.
- Bitancourt, A. A. (1955). Estudos sobre a leprose dos citros. *Arq. Inst. Biol.* 22:161-231.
- Blanchfield, A.L.; Mackenzie A.M.; Gibbs A.; Kondo H.; Tamada T.; Wilson C.R. (2001). Identification of Orchid fleck virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and analysis of isolate relationships. *J. Phytopathol.*, 149:713-718.
- Boaretto, M.A.C.; Chiavegato, L.G. (1994). Transmissão da leprose por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) temporariamente mantidos em hospedeiros intermediários, em condições de laboratório. *Científica*, 22:81-93.
- Boaretto, M.A.C.; Chiavegato, L.G.; Silva, C.A.D. (1993). Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. *Científica*, 21:245-253.
- Boari, A.J.; Freitas-Astúa, J.; Ferreira, P.T.O.; Neder, D.G.; Nogueira, N.L.; Rossi, M.L.; Kitajima, E.W. (2004). Purification and serology of the Coffee ringspot virus. *Summa Phytopathol.*, 30:453-458.
- Boava, L.; Cristofani-Yaly, M.; Mafra, V.S.; Kubo, K.S.; Kishi, L.; Takita, M.A.; Machado, M.A. (2011). Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*, 12(39). doi:10.1186/1471-2164-12-39.
- Boava, L.P.; Laia, M.L.; Jacob, T.R.; Dabbas, K.M., Gonçalves, J.F.; Ferro, J.A.; Ferro, M.I.; Furtado, E.L. (2010) Selection of endogenous genes for gene expression studies in

- Eucalyptus under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-Smethyl) stresses using RT-qPCR. *BMC Res Notes*, 24:3:43.
- Bol, J. F.; Linthorst, H.J.M.; Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:114-138.
- Boller, T.; Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60: 379–406.
- Bolstad, B.M.; Irizarry, M.A.; Astrand, M.; Speed, T.P.A. (2003) Comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19: 185-193.
- Bolwell, G.P.; Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant P.*, 51, 347-366.
- Boudsocq, M.; Willmann, M.R.; McCormack, M.; Lee, H.; Shan, L.; He, P.; Bush, J.; Cheng, S.; Sheen, J. (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature*, 464(7287): 418–422.
- Bowles, J.D. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:873-907.
- Brown, P.O.; Botstein, D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.*, 21:33-37.
- Bruno, A.K.; Wetzel, M. (2004). The early light-inducible protein (*ELIP*) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, 55(408):2541-2548.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists).
- Buchel, A.S.; Linthorst, H.J.M. (1999). PR-1: a group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke, J. D.; Volko, S.; Dong, X. (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57–63.

- Carmell, M.A.; Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Biol.*, 11:214-8.
- Carstens, E.B. (2010) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, 155:133–146.
- Casu, R.; Dimmock, C.; Chapman, S.; Grof, C.; McIntyre, C.L.; Bonnett, G.; Manners, J. (2004). Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Mol. Biol.*, 54:503-517.
- Cernadas, R.A.; Camillo, L.R.; Benedetti, C.E. (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. *Mol. Plant Pathol.*, 9(5): 609-631
- Chagas, C.M.; Rossetti, V.V. (1984). Transmission of leprosis by grafting. Pages 215-217. In: Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol. S. M. Garnsey, L. W. Timmer, and J. A. Dodds, eds. IOCV, Riverside, USA.
- Chao, L.; Tran, T.T.; Tran, T.T. (1997). The advantage of sex in the RNA virus u6. *Genetics*, 147: 953-959.
- Chen, C.; Chen, Z. (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 42:387-396.
- Chen, C.; Chen, Z. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant Physiol.*, 129(2):706-716.
- Chen, W.; Provar, N. J.; Glazebrook, J.; Katagiri, F.; Chang, H. S.; Eulgem, T.; Mauch, F.; Luan, S.; Zou, G.; Whitham, S. A.; Budworth, P. R.; Tao, Y.; Xie, Z.; Chen, X.; Lam, S.; Kreps, J. A.; Harper, J.F.; Si- Ammour, A.; Mauch-Mani, B.; Heinlein, M.; Kobayashi, K.; Hohn, T.; Dangl, J.L.; Wang, X.; Zhu, T. (2002). Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14:559-574.
- Chiavegato, L.G.; Mischán, M.M.; Silva, M.A. (1982). Prejuízos e transmissibilidade de sintomas de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) Sayed, 1946 (Acari, Tenuipalpidae) em citros. *Científica*, 10: 265-271.
- Childers, C.C.; Derrick, K.S. (2003). *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:1-3.

- Choudhari, K.G.; Mali, V.R. (1978). Leprosis disease and its role in citrus dieback. *Sci. Cult.*, 44:166-167.
- Christopher-Kozjan, R.; Heath, M.C. (2003). Cytological and pharmacological evidence that biotrophic fungi trigger different cell death execution processes in host and nonhost cells during the hypersensitive response. *Physiol. Mol. Plant P.*, 62: 265–275.
- Ciolkowski, I.; Wanke, D.; Birkenbihl, R.; Somssich, I. (2008). Studies on DNAbinding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol. Biol.*, 68: 81–92.
- Clarke, S.F.; Guy, P.L., Burritt, D.J.; Jameson, P.E. (2002) Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiol. Plantarum*, 114: 157–164.
- Colariccio, A.; Lovisolo, O.; Chagas, C.M.; Galetti, S.R.; Rossetti, V.V.; Kitajima, E.W. (1995). Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. *Fitopatol. Bras.*, 20:208-213.
- Covington, M.F.; Maloof, J.N.; Straume, M.; Kay, S.A.; Harmer, S.L. (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.*, 9:R130 (doi:10.1186/gb-2008-9-8-r130).
- Creelman, R.A.; Mulpuri, R (2002). The oxylipin pathway in Arabidopsis. In CR Somerville, EM Meyerozitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1–24, 95(4).
- Cristofani-Yaly, M.; Berger I.J.; Targon, M.L.P.N.; Takita, M.A.; Dorta, S.O.; Freitas-Astúa, J.; Souza, A.A.; Camargo, Boscariol, R.L.; Reis, M.S.; Machado, M.A. (2007). Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through ESTs analysis using an in silico hybridization. *Genet. Mol. Biol.*, 30: 972-979.
- Day, B.; Dahlbeck, D.; Staskawicz, B.J. (2006). NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18:2782–91.
- Denoux, C.; Galletti, R.; Mammarella, N.; Gopalan, S.; Werck, D.; Lorenzo, G.; Ferrari, S.; Ausubel, F.M.; Dewdney, J. (2008) Activation of Defense Response Pathways by OGs and Flg22 Elicitors in *Arabidopsis* Seedlings. *Mol.Plant*, 1(3): 423–445.

- Dixon, D.C.; Cutt, J.R.; Klessig, F.D. (1991). Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J.*, 10, 1317–1324.
- Dong, J.; Chen, C.; Chen, Z. (2003) Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.*, 51: 21–37.
- Dong, J.Z.; Dunstan, D.I. (1997) Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*, 201(2):189-194.
- Draper, J. (1997). Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci.*, 2:162–65.
- Durrant, W.E; Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42:185–209.
- Eulgem, T.; Rushton, P.J.; Schmelzer, E.; Hahlbrock, K.; Somssich, I.E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.*, 18: 4689–4699.
- Eulgem, T.; Somssich, I.E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 366–371.
- Escaler, M.; Aranda, M.A.; Roberts, I.M.; Thomas, C.L.; Maule, A.J. (2000) A comparison between virus replication and abiotic stress (heat) as modifiers of host gene expression. *Mol. Plant Pathol.*, 1:159-167.
- Espinoza, C.; Medina, C., Somerville, S.; Arce-Johnson, P. (2001). Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *J. Exp. Botany*, 58(12): 3197–3212. doi:10.1093/jxb/erm165
- Fabro, G.; Kovács, I.; Pavet, V.; Szabados, L.; Alvarez, M.E. (2004). Proline Accumulation and AtP5CS2 Gene Activation are Induced by Plant-Pathogen Incompatible Interactions in Arabidopsis *Mol. Plant Microbe Interact.*, 17 (4): 343–350.
- Fawcett, H. S. (1936). *Citrus Diseases and Their Control*. 2nd ed. McGraw- Hill, New York.
- Felton, G.W.; Tumlinson, J.H. (2008) Plant-insect dialogs: complex interactions at the plant-insect interface. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 457–463.
- Ferreira, P.T.O.; Locali, E.C.; Freitas-Astúa, J.; Antonioli-Luizon, R.; Gomes, R.T.; Machado, M.A.; Kitajima, E.W. (2007). Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum*

violaefolium transmitido pelos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). Summa Phytopathol., 33:264-269.

- Feys, B.J.; Wiermer, M.; Bhat, R.A.; Moisan, L.J.; Medina-Escobar, N.; Neu, C.; Cabral, A.; Parker, J.E. (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*, 17: 2601–2613.
- Flor, H.H. (1947). Inheritance of reaction to rust in flax. *Jour. Agr. Res.* 74: 241-262.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275–296.
- Fodor, J.; Gullner, G.; Adám, A.L.; Barna, B.; Kömives, T.; Király, Z. (1997) Local and systemic responses of antioxidants to *Tobacco mosaic virus* infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiol.*, 114: 1443–1451.
- Forner-Giner, M.A.; Llosa, M.J., Carrasco, J.S.; Perez-Amador, M.A.; Navarro, L.; Ancillo, G. (2010). Differential gene expression analysis provides new insights into the molecular basis of iron deficiency stress response in the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *J. Exp. Botany*, 61(2): 483–490.
- Foote, C.S. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162: 963–970.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Plant Physiol.*, 119: 355–364.
- Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Locali-Fabris, E.C.; Novelli, V.M.; Silva-Pinhati, A.C.; Basílio-Palmieri, A.C.; Targon, M.L.P.N.; Machado, M.A. (2007) Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus–citrus leprosis virus interaction. *Genet. Mol. Biol.*, 30:980–1018.
- Fregene, M.; Matsumura, H.; Akano, A.; Dixon, A.; Terauchi, R. (2004) Serial analysis of gene expression (SAGE) of host-plant resistance to the cassava mosaic disease (CMD). *Plant Mol Biol.*, 56: 563–571.
- Frezzi, M. J. (1940). La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bela Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas*. Buenos Aires. Min. Agric. Nación. n. 5.

- Gandía, M.; Conesa, A.; Ancillo, G.; Gadea, J.; Forment, J.; Pallás, V.; Flores, R.; Duran-Vila, N.; Moreno, P.; Guerri, J. (2007). Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 367(2): 298-306.
- Gechev, T.S.; Gadjev, I.Z.; Hille, J. (2004). An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61: 1185–1197.
- Gibbs, A.; Mackenzie, A. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 63:9-16.
- Golem, S.; Culver, J.N. (2003). *Tobacco mosaic virus*-induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16:681-688.
- Gollnick, K. (1968) Type 2 photosensitized oxygenation reactions. *Adv. Chem. Ser.*, 77: 78–101.
- Grant, M.; Lamb, C. (2006) Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol.*, 9: 414–420.
- Gullner, G.; Tóbiás, I.; Fodor, J.; Kömives, T. (1999) Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Radic Res.*, 31: S155–S161.
- Gutierrez, C. (2000). Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.*, 43: 763–772.
- Halliwell, B. (2006) Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol.*, 141:312-322.
- Hammond, S.M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293–296.
- Hammond, S.M.; Boettcher, S.; Caudy, A.A.; Kobayashi, R.; Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293: 1146–1150.
- Harvey, J.J.W.; Lewsey, M.G.; Patel, K.; Westwood, J.; Heimstadt, S.; Carr, J.P.; Baulcombe, D.C. (2011). An Antiviral Defense Role of AGO2 in Plants. *PLoS ONE*, 6(1): e14639.doi:10.1371/journal.pone.0014639.
- Heath, M.C. (2000). Advances in imaging the cell biology of plant microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38: 443–459.
- Hegedus, D.; Yu, M.; Baldwin, D.; Gruber, M.; Sharpe, A.; Parkin, I.; Whitwill, S.; Lydiate, D. (2003) Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol. Biol.*, 53: 383–397

- Hernández, J.A.; Jiménez, A.; Mullineaux, P.M.; Sevilla, F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.*, 23: 853–862.
- Hernandez, J.A.; Díaz-Vivancos, P.; Rubio, M.; Olmos, E.; Ros-Barcelo, A.; Martínez-Gomez, P. (2006). Long-term *Plum pox virus* infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot, *Prunus armeniaca*, cultivar but not in a resistant cultivar. *Physiol. Plantarum*, 126: 140–152.
- Hernández, J.A.; Rubio, M.; Portillo, B.; Dicenta, F.; Martínez- Gómez, P. (2003) Response of antioxidant enzymes from peach (*Prunus persica* L. cv GF305) to *Plum pox virus* infection. *Free Radic Res.* 37, 14.
- Hills, G.J.; Plaskitt, K.A.; Young, N.D.; Dunigan, D.D.; Watts, J.W.; Wilson, T.M.A.; Zaitlin, M. (1987) Immunogold localization of the intracellular sites of structural and non-structural tobacco mosaic virus proteins. *Virology*, 161: 488-496.
- Hinderhofer, K.; Zentgraf, U. (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* 213: 469–473.
- Hoffman, T.; Schmidt, J.S.; Zheng, X.; Bent, A. (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*, 119: 935-949.
- Howe, G.A. (2004) Jasmonates as signals in the wound response. *J. Plant Growth Regul.*, 23: 223–237.
- Hu, X.; Bidney, D.L.; Yalpani, N.; Duvick, J.P.; Crasta, O.; Folkerts, O.; Lu, G. (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, 133: 170-81.
- Hu, J.; Zhou, J.; Peng, X.; Xu, H.; Liu, C.; Du, B.; Yuan, H.; Zhu, L.; He, G. (2011). The Bphi008a gene interacts with the ethylene pathway and transcriptionally regulates MAPK genes in the response of rice to brown planthopper feeding. *Plant Physiology*, 156: 856–872.
- Hughes, T.R.; Mao, M.; Jones, A.R.; Burchard, J.; Marton, M.J.; Shannon, K.W.; Lefkowitz, S.M.; Ziman, M.; Schelter, J.M.; Meyer, M.R., *et al.* (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.*, 19: 342–347.
- Hull, R.; Matthews, R.E.F. (2002). *Matthews plant virology*. Academic Press, p.1001.

- Jackson, A.O.; Dietzgen, R.G.; Goodin, M.M.; Bragg, J.N.; Deng, M. (2005). Biology of Plant Rhabdoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 623-660.
- Jaubert, M.; Bhattacharjee, S.; Mello, A.F.; Perry, K.L.; Moffett, P. (2011) ARGONAUTE2 mediates RNA silencing anti-viral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 156: 1556–1564.
- Jones, J.D.; Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323–329.
- Kalde, M.; Barth, M.; Somssich, I.E.; Lippok, B. (2003). Members of the *Arabidopsis* WRKY Group III Transcription Factors Are Part of Different Plant Defense Signaling Pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 16 (4): 295–305.
- Kaloshian, I.; Walling, L.L. (2005) Hemipterans as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 491–521.
- Kappers, I.F.; Aharoni, A.; van Herpen, T.W.J.M.; Luckerhoff, L.L.P.; Dicke, M.; Bouwmeester, H.J., (2005). Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 309, 2070–2072.
- Katagiri, F.; Lam, E.; Chua, N.H. (1989). Two tobacco DNA- binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, 340: 727-730.
- Kazan, K.; Manners, J.M. (2008). Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant Physiol.* 146: 1459–1468.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25(4), 402-408.
- Kim, M.C.; Chung, W.S.; Yun, D.; Cho, M.J. (2009) Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants. *Mol. Plant*, 2 (1): 13–21.
- Kim, C.; Meskauskiene, R.; Apel, K. ; Laloi, C. (2008). No single way to understand singlet oxygen signaling in plants. *EMBO Rep.*, 9 (5): 435-439.
- Kitajima, E.W.; Ferreira, P.T.O.; Freitas-Astúa, J.; Machado, M.A. (2004). Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. *Summa Phytopathol. (suppl.)*, 30:68 (abstract).
- Kitajima, E.W.; Kubo, K.S.; Ferreira, P.T.O.; Alcantara, B.K.; Boari, A.J.; Gomes, R.T.; Freitas-Astúa, J.; Rezende, J.A.M.; Moraes, G.J.; Salaroli, R.B. (2008). Clerodendron chlorotic spot: a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae)-transmitted virus. *Sci. Agric.*, 65:36-49.

- Kitajima, E.W.; Müller, G.W.; Costa, A.S.; Yuki, W. (1972). Short, rodlike particles associated with citrus leprosis. *Viol.*, 50:254-258.
- Kitajima, E.W.; Rezende, J.A.M.; Rodrigues, J.C.V. (2003) Passion Fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in passion fruit in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.*, 30: 225-231.
- Kitajima, E.W., Rodrigues, J.C.V; Freitas-Astúa, J. (2010). An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite transmitted viruses. *Sci. Agric.*, 67:348-371.
- Klessig, D.F.; Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.*, 26: 1-20.
- Knorr, L.C. (1950). Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. *Phytopathol.*, 40:15-53.
- Knorr, L. C. (1968). Studies on the etiology of leprosis in citrus. Pages 332- 340 in: J. F. L. Childs, ed. Proc. 4th Conf. Int. Org. Citrus Virol. IOCV, Gainesville, USA.
- Knoth, C.; Ringler, J.; Dangl, J.L.; Eulgem, T. (2007) Arabidopsis WRKY70 is required for full RPP4-mediated disease resistance and basal defense against *Hyaloperonospora parasitica*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 20: 120–128.
- Kokkinos, C.D.; Clark, C.A. (2006). The effect of sweet potato virus disease and its viral components on gene expression levels in sweet potato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 131(5): 657-666.
- Kondo, H.; Maeda, T.; Shirako, Y.; Tamada, T. (2006) Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J. Gen. Virol.*, 87:2413-21.
- Kondo, H., Maeda, T.; Tamada, T. (2003). Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:215-223.
- Krzymowska, M.; Konopka-Postupolska, D.; Sobczak, M.; Macioszek, V.; Ellis, B.E.; Hennig, J. (2007). Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *Plant J.*, 50: 253–264.
- Kubo, K.S., Stuart, R.M., Freitas-Astúa, J.; Antonioli-Luizon, R., Locali-Fabris, E.C., Coletta-Filho, H.D., Machado, M.A.; Kitajima, E.W. (2009). Evaluation of the genetic variability of Orchid fleck virus by single-strand conformational polymorphism analysis and nucleotide sequencing of a fragment from the coat protein gene. *Arch. Virol.*, 154:1009-1014.

- Kubo, K.S.; Novelli, V.M.; Bastianel, M.; Antonioli-Luizon, R.; Machado, M.A.; Freitas-Astúa, J. (2011). Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. *Exp. Appl. Acarol.*, 54:33–39.
- Kuc, J. (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience*, 32: 854-860.
- Kuc, J. (1982). Induced immunity to plant disease. *BioScience*, 32: 854-860.
- Kunkel, B.N; Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:325–331.
- Laitinen, R. (2008). The Gerbera cDNA Microarray: A Tool for LargeScale Identification of Genes Involved in Flower Development. Academic dissertation, University of Helsinki Finland.
- Laudert, D.; Weiler, E.W. (1998) Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.*, 15: 675–684.
- Lebel, E.; Heifetz, P.; Thorne, L.; Uknes, S.; Ryals, J. *et al.* (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 16:223–33.
- Lecourieux, D.; Mazars, C.; Pauly, N.; Ranjeva, R.; Pugin, A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*, 14: 2627–2641.
- Lesemann, D.; Doraiswamy, S. (1975). Bullet-shaped virus-like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. *Phytopathol. Z.*, 83: 27–39.
- Li, J.; Brader, G.; Kariola, T.; Palva, E.T. (2006). *WRKY70* modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.*, 46:477- 491.
- Li, J.; Brader, G.; Palva, E.T. (2004). The *WRKY70* transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 16:319-331.
- Li, R.; Zhang, J.; Wei, J.; Wang, H.; Wang, Y.; Ma, R. (2009). Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in Plant response to abiotic stress. *Progr. Nat. Science* 19: 667-676.
- Lingel, A.; Simon, B.; Izaurralde, E.E; Sattler, M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426: 465–469.
- Linthorst, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10: 123-150.

- Lipshutz, R.J.; Fodor, S.P.; Gingeras, T.R.; Lockhart, D.J. (1999). High-density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.*, 21:20–24.
- Liu, J.; Carmell, M.A.; Rivas, F.V.; Marsden, C.G.; Thomson, J.M.; Song, J.J.; Hammond, S.M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G.J. (2004). Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305: 1437–1441.
- Locali, E.C., Freitas-Astúa, J., Souza, A.A., Takita, M.A., Astúa-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E.W.; Machado, M.A. (2003). Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. *Plant Dis.*, 87:1317-1321.
- Locali-Fabris, E.C.; Freitas-Astúa, J.; Souza, A.A.; Takita, M.A.; Astúa-Monge, G.; Antonioli-Luizon, R.; Rodrigues, V.; Targon, M.L.P.N.; Machado, M.A. (2006). Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C). *J. Gen. Virol.*, 87:2721-2729.
- Lorenzo, O.; Chico, J.M.; Sanchez-Serrano, J.J.; Solano, R. (2004) JASMONATEINSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell*, 16: 1938–1950.
- Lotan, T.; Ori, N.; Fluhr, R. (1989). Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *The Plant Cell*, 1: 881–887.
- Lund, S.T.; Stall, R.E.; Klee, H. (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, 10: 371-382.
- Luo, M.; Dang, P.; Bausher, M.G.; Holbrook, C.C.; Lee, R.D.; Lynch, R.E.; Guo, B.Z. (2005) Identification of Transcripts Involved in Resistance Responses to Leaf Spot Disease Caused by *Cercosporidium personatum* in Peanut (*Arachis hypogaea*). *Phytopathology*, 95(4): 381-387.
- Maeo, K.; Hayashi, S.; Kojima-Suzuki, H.; Morikami, A.; Nakamura, K. (2001) Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 2428–2436.
- Maleck, K.; Levine, A.; Eulgem, T.; Morgan, A.; Schmid, J.; Lawton, K.A.; Dangl, J.L.; Dietrich, R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*, 26: 403–410.

- Marathe, R., Guan, Z., Anandalakshmi, R., Zhao, H.; Dinesh-Kumar, S.P. (2004). Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol. Biol.*, 55:501-520.
- Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110, 563–574.
- Maule, A.; Leh, V.; Lederer, C. (2002). The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions, *Curr. Opin. Plant Biol*, 5. doi 10.1016/S1369-5266(02)00272-8.
- McCormack, E.; Braam, J. (2003). Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 159: 585–598.
- McCormack, E.; Tsai, Y.C.; Braam, J. (2005) Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10: 383–389.
- Meister, G.; Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343–349.
- Mekhedov, S.; Ilárduya, O.M.; Ohlrogge, J. (2000) Toward a Functional Catalog of the Plant Genome. A Survey of Genes for Lipid Biosynthesis, *Plant Physiol*, 122, 389– 401.
- Meyers, B.C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuang, H.; Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:809-834.
- Miao, Y.; Laun, T.; Zimmermann, P.; Zentgraf, U. (2004). Targets of the *WRKY53* transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55: 853–867.
- Miao, W; Wang, X; Li, M.; Song, C.; Wang, Y.; Hu, D.; Wang, J. (2010) Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaXoo* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism. *BMC Plant Biol.*, 10: 67. doi:10.1186/1471-2229-10-67.
- Miao, Y.; Zentgraf, U. (2007). The antagonist function of *Arabidopsis* *WRKY53* and *ESR/ESP* in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell*, 19:819–830. doi:10.1105/tpc.106.042705
- Mithöfer, A.; Boland, W. (2008) Recognition of herbivory-associated molecular patterns. *Plant Physiol* 146: 825–831.
- Mölders, W.; Buchala, A.; Mètraux, J.P. (1996). Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol.*, 112:787–92.
- Mur, L.A.J.; Kenton, P., Lloyd, A.J.; Ougham, H.; Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Botany*, 59(3): 501–520.

- Mussumeci, M.R.; Rossetti, V.V. (1963). Transmissão dos sintomas daleprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Ciência e Cultura*, 15:228 (abstract).
- Naton, B.; Hahlbrock, K.; Schmelzer, E. (1996). Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.*, 112: 433–444.
- Neves, M.F.; Trombin, V.G.; Milan, P.; Lopes, F.F.; Cressoni, F.; Kalaki, R. (2010). O Retrato da Citricultura Brasileira, Ribeirão Preto, Markestrat, 138p.
- Norman-Setterblad, C.; Vidal, S.; Palva, E.T. (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13:430-438.
- Novelli, V.M.; Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Locali-Fabris, E.C.; Antonioli-Luizon, R.; Ribeiro, B.M.; Machado, M.A. (2007). Detecção do vírus da leprose dos citros no ácaro vetor. *Laranja* 28:39-46.
- O'Rourke, J.A.; Nelson, R.T.; Grant, D.; Schmutz, J.; Grimwood, J.; Cannon, S.; Vance, C.P.; Graham, M.A.; Shoemaker, R.C. (2009). Integrating microarray analysis and the soybean genome to understand the soybeans iron deficiency response. *BMC Genomics*, 2009, 10:376 doi:10.1186/1471-2164-10-376
- Pandey, S.P.; Somssich, I.E. (2009) The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiol.*, 150: 1648–1655.
- Pascon, R.C.; Kitajima, J.P.; Breton, M.C.; Assumpção, L.; Greggio, C.; Zanca, A.; Okura, V.K.; Alegria, M.C.; Camargo, M.E.; Silva, G.G.C.; Cardozo, J.C.; Vallim, M.A.; Franco, S.F.; Silva, V.H.; Jordão, Júnior H.; Oliveira, F.; Giachetto, P.F.; Ferrari, F.; Aguillar-Vildoso, C.I.; Francischini, F.J.B.; Silva, J.M.F.; Arruda, P.; Ferro, J.A.; Reinach, F.; Silva, A.C.R. (2006). The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLVC). *Virus Gene*, 32:289-298.
- Penninckx, I.A.; Thomma, B.P.; Buchala, A. *et al* (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:2103–2113.
- Pieterse, C.M. ;Van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid- independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, 4, 52-58.
- Pontier, D.; Balague, C.; Bezombes, M.I.; Tronchet, M.; Deslandes, L.; Roby, D. (2001) Identification of a novel pathogen-responsive element in the promoter of the tobacco gene *HSR203J*, a molecular marker of the hypersensitive response. *Plant J.*, 26:495-507

- Pontier, D.; Godiard, L.; Marco, Y.; Roby, D. (1994) *Hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant. *Plant J.*, 5:507-521.
- Pré, M.; Atallah, M.; Champion, A.; De Vos, M.; Pieterse, C. M. J.; Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor *ORA59* integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.*, 147:1347-1357.
- Qu, F.; Ye, X.; Morris, T.J. (2008) Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 14732–14737.
- Raguso, R.A., (2004). Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 434–440.
- Rasmussen, J.B.; Hammerschmidt, R.; Zook, M.N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.*, 97:1342–47.
- R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rebrikov, D.V.; Trofimov, D.Yu (2006) Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis. *Appl. Biochem. Micro+*, 42(5): 455–463.
- Reddy V.S. and A.S.N. Reddy (2004) Proteomics of Calcium-signaling components in plants. *Phytochem.*, 65:1745-1776.
- Ren, T.; Qu, F.; Morris, T.J. (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell*, 12: 1917–1925.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M.; Farmer, E.E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12: 707–720.
- Riedle-Bauer, M. (2000) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *J. Phytopathol.*, 148: 297–302.
- Ritz, C.; Spiess, A.N. (2008). qPCR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics*, doi 10.1093/bioinformatics/btn227.

- Rivière, M.P.; Marais, A.; Ponchet, M.; Willats, W.; Galiana, E. (2008). Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular β -(1/3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *J. Exp. Botany*, 59(6): 1225–1239.
- Rodrigues, J.C.V. (1995). Leprose dos citros: cito-patologia, transmissibilidade e relação com o vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). MSc Dissertation, University of São Paulo, Piracicaba, SP, 79 pp.
- Rodrigues, J.C.V., Kitajima, E.W., Childers, C.C.; Chagas, C.M. (2003). Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:161-179.
- Rodriguez, V.; Bastianel, M.; Kubo, K.S.; Fadel, A.L.; Nicolini, F.; Novelli, V.; Freitas-Astúa, J. (2007) Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. *Laranja*, 28: 29-38.
- Roessing, C.; Salibe, A.A. (1967). Incidência da leprose em variedades cítricas. *Ciência e Cultura*, v.19, p.303.
- Ross, A.F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14:340–58.
- Ryals, J.; Neuenschwander, U.; Willits, M.; Molina, A.; Steiner, H. Y.; Hunt, M. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1809–1819.
- Sambrook, J; Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 3rd edition,
- Salva, R. A.; Massari, C. A. (1995). Situação do ácaro da leprose no Estado de São Paulo, levantamento – Fundecitrus, agosto 1995. Pages 13-18. In: *Leprose dos citros*. C. A. L. Oliveira and L. C. Donadio, eds. FUNEP, Jaboticabal, Brazil.
- Sargent, T.D. (1987) Isolation of Differentially Expressed Genes. *Method. Enzymol.*, 152, p.423-432.
- Schafer, M.; Fischer, C.; Meldau, S.; Seebald, E.; Oelmüller, R.; Baldwin, I.T. (2011). Lipase Activity in Insect Oral Secretions Mediates Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 156: 1520-1534.
- Schaffer, R.; Landgraf, J.; Accerbi, M.; Simon, V.; Larson, M.; Wisman, E. (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13:113-123.

- Schena, M.; Heller, R.A.; Theriault, T.P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E.; Davis, R.W. (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.*, 16: 301–306.
- Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W.; Brown, P.O. (1995). *Science*, 270: 467 - 470.
- Schmelz, E.A.; Engelberth, J.; Alborn, H.T.; Tumlinson, J.H. III; Teal, P.E.A. (2009) Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 653–657.
- Schneider, D.J.; Collmer, A. (2010). Studying plant-pathogen interactions in the Genomics era: Beyond molecular Koch's Postulates to Systems Biology. *Ann. Rev. of Phytopathol.*, 48:457-479.
- Scholthof, H.B.; Alvarado, V.Y.; Vega-Arreguin, J.C.; Ciomperlik, J.; Odokonyero, D.; Brosseau, C.; Jaubert, M.; Zamora, A.; Moffett, P. (2011). Identification of an Argonaute for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.*, 156: 1548-1555.
- Segonzac, C.; Zipfel, C. (2011) Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14:54–61.
- Selth, L.A.; Dogra, S.C.; Rasheed, M.S.; Healy, H.; Randles, J.W.; Rezaian, M.A. (2005) A NAC domain protein interacts with Tomato leaf curl virus replication accessory protein and enhances viral replication. *Plant Cell*, 17: 311–325.
- Seo, H.S.; Watanabe, E.; Tokutomi, S.; Nagatani, A.; Chua, N.H. (2004). Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev.*, 18: 617–622.
- Shim, K. S., Kang, K. H., Chung, Y. S., Choi, H. C., Kwang, H. G., Ok, S. H., Jeung, J. U., Cho, S. K., You, M. K.; Jung, K. W. (2004). Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice. *Plant Cell Rep.*, 22:599–607. doi 10.1007/s00299-003-0742-2.
- Shimizu, T.; Satoh, K.; Kikuchi, S.; Omura, T. (2007). The Repression of Cell Wall- and Plastid-Related Genes and the Induction of Defense-Related Genes in Rice Plants Infected with *Rice dwarf virus*. *Mol. Plant Microbe in.*, 20(3): 247–254.
- Smyth, G.K. (2004) "Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments," *Stat. Appl. Genet. Mol.*, 3(1), Article 3.
- Smyth, G.K. (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman, R.; Carey, V.; Dudoit, S.; Irizarry, R.; Huber, W. (Ed.). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer, 2005. cap. 23, p. 397-420.

- Singh-Gasson, S.; Green, R.D.; Yue, Y.; Nelson, C.; Blattner, F.; Sussman, M.R.; Cerrina, F. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol.*, 17: 974–978.
- Shimmen, T.; Yokota, E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 68–72.
- Shirasu, K.; Nakajima, H.; Rajasekhar, V.K.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, 9:261–270.
- Shulaev, V.; Léon, J.; Raskin, I. (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell*, 7:1691–701.
- Song, J.J.; Smith, S.K.; Hannon, G.J.; Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305: 1434–1437.
- Souza, A.A.; Takita, M.A.; Coletta-Filho, H.D.; Targon, M.L.P.N.; Carlos, E F.; Locali-Fabris, E.C.; Amaral, A.M.; Freitas-Astúa, J.; Pinhati, A.C.O.S.; Boscardiol, R.L ; Berger I.J.; Rodrigues, C.M.; Reis, M.S.; Machado, M.A. (2007) Analysis of expressed sequence tags from *Citrus sinensis* L. Osbeck infected with *Xylella fastidiosa*. *Genet. Mol. Biol.*, 30, 957-964.
- Spegazzini, C. (1920). Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. *Ann. Soc. Cient.*, 90:155-188.
- Staswick, P.E.; Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2117–2127.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B.; Mettraux, J. P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 235–270.
- Stuart, R.M. (2011). Citros x *Alternaria alternata* patótipo tangerina: análise da interação planta-patógeno, PhD thesis, UNICAMP, Campinas, 135p.
- Terol, J.; Conesa, A.; Colmenero, J.M; Cercos, M.; Tadeo, F.; Agustí, J.; Alós, E.; Andres1, F.; Soler, G.; Brumos, J.; Iglesias, I.J.; Götz, S.; Legaz, F.; Argout, X.; Courtois, B.; Ollitrault, P.; Dossat, C.; Wincker, P.; Morillon, R.; Talon, M. (2007). Analysis of 13000 unique *Citrus* clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics*, 8:31. doi:10.1186/1471-2164-8-31.
- Thimm, O.; Essigmann, B.; Kloska, S.; Altmann, T.; Buckhout, T.J. (2001). Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127:1030-1043.

- Thines, B.; Katsir, L.; Melotto, M.; Niu, Y.; Mandaokar, A.; Liu, G.; Nomura, K.; He, S.Y.; Howe, G.A.; Browse, J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448: 661–665.
- Thomma, B.P.H.J.; Eggermont, K.; Tierens, K.F.M.J.; Broekaert, W.F. (1999) Requirement of functional Ethylene- Insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, 121: 1093-1101.
- Thomma, B.P.; Penninckx, I.A.; Broekaert, W.F.; Cammue, .B.P. (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr. Opin. Immunol.*, 13:63–68.
- Tör, M.; Lotze, M.T.; Holton, N. (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.*, 60(13): 3645–3654.
- Trindade, M.L.B.L; Chiavegato, L.G. (1990) Colonização por *Brevipalpus obovatus* (Donnadieu, 1875), *Brevipalpus californicus* (Banks, 1904) e *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em variedades cítricas. *Laranja*: 11(1): 227-240.
- Trinks, D.; Rajeswaran, R.; Shivaprasad, P.V.; Akbergenov, R.; Oakeley, E.J.; Veluthambi, K.; Hohn, T.; Pooggin, M.M. (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.*, 79: 2517–2527.
- Trujillo, M.; Ichimura. K.; Casais, C.; Shirasu, K. (2008) Negative Regulation of PAMP-Triggered Immunity by an E3 Ubiquitin Ligase Triplet in Arabidopsis. *Curr. Biol.*, 18, 1396–1401.
- Turck, F.; Zhou, A.; Somssich, I.E. (2004) Stimulus-dependent, promoter specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene PcPR1–1 in parsley. *Plant Cell*, 16: 2573–2585.
- Turner, J.G.; Ellis, C.; Devoto, A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell (Suppl)* 14: S153–S164.
- Ulmasov, T.; Liu, L.B.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell*, 7: 1611-1623.
- Vadassery, J.; Oelmüller, R. Calcium signaling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions. (2009) *Plant Signal. Behav.*, 4(11): 1024-1027.
- Vandesompele, J.; Preter, K. D.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Roy, N. V.; Paepe, A. D.; Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*,3(7): research0034.1–0034.11.
- Van Loon, LC. (1985). Pathogenesis Related Proteins. *Plant Mol. Biol.*, 4:111-116.

- Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M. (2006) Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44:135–162.
- Van Loon, L.C.; Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55:85-97.
- van Verk, M.C.; Pappaioannou, D.; Neeleman, L.; Bol, J.F.; Linthorst, H.J.M. (2008) A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-1A gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors. *Plant Physiol.*, 146: 1983–1995.
- Vaucheret, H. (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.*, 13: 350–358.
- Verdel, A.; Jia, S.; Gerber, S.; Sugiyama, T.; Gygi, S.; Grewal, S.I. e Moazed, D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 303: 672–676.
- Vergani, A.R. (1945). Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo. Ministerio de Agricultura de la Nación. Buenos Aires. Instituto Sanidad Vegetal. Ser. A.5:1-11.
- Vlot, A.C.; Liu, P.P.; Cameron, R.K. *et al.* (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 56: 445–456.
- Voelckel, C.; Baldwin, I.T. (2004) Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. *Plant J.*, 38: 650–663.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, 17, 449–459.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136: 669–687.
- Xie, D.; Feys, B.F.; James, S.; Neito-Rostro, M.; Turner, J.G. (1998). *COII*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280:1091-1094.
- Xie, Q., Frugis, G.; Colgan, D.; Chua, N.H. (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, 14: 3024–3036.
- Xie, Q.; Sanz-Burgos, A.P.; Guo, H.; Garcia, J.A.; Gutierrez, C. (1999) GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol. Biol.*, 39: 647–656.
- Ward, E.R.; Uknes, S.J.; Williams, S.C.; Dincher, S.S.; Wiederhold, D.L.; Alexander, D.C.; Ahl-Goy, P.; Metraux, J.P.; Ryals, J.A. (1991) Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 3(10):1085–1094.

- Wang, M.B.; Li, Z.Y.; Matthews, P.R.; Upadhyaya, N.M.; Waterhouse, P.M. (1998) Improved vectors for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of monocot plants. *Acta Hort.*, 461: 401-407.
- Wang, L.; Tsuda, K.; Sato, M.; Cohen, J.D.; Katagiri, F., *et al.* (2009) Arabidopsis CaM Binding Protein CBP60g Contributes to MAMP-Induced SA Accumulation and Is Involved in Disease Resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* 5(2): e1000301
- Wang, Y.Y.; Wang, X.L.; Yuan, H.Y.; Chen, R.Z.; Zhu, L.L.; He, R.F.; He, G.C. (2008) Responses of two contrasting genotypes of rice to brown planthopper. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 21: 122–132.
- Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X.; Hou, Y.M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.*, 33:271-283.
- Wu, J.; Baldwin, I.T. (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.*, 44: 1–24.
- Yoda, H.; Ogawa, M.; Yamaguchi, Y.; Koizumi, N.; Kusano, T.; Sano, H. (2002). Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to *Tobacco mosaic virus* and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics*, 267:154-161.
- Yu, D.; Chen, C.; Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*, 13(7):1527-1540.
- Zhang, Y.; Xu, S.; Ding, P.; Wang, D.; Cheng, Y.T.; He, J.; Gao, M.; Xu, F.; Li, Y.; Zhu, Z.; Li, X.; Zhang, Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *PNAS*, 107 (42): 18220–18225.

ANEXO 1

**Tabela de genes diferencialmente expressos considerando a interação entre EGA: EV
obtida a partir de *two-way* ANOVA e p-valor**

Probe	Symbol	Description	GenBank	Gene Ontology	logFC	AveEx pr	adj.P. Val	odds. Prob
100747	ATHAP2A, EMB2220, HAP2A, NF- YA1	Encodes a subunit of CCAAT-binding complex, binds to CCAAT box motif present in some plant promoter sequences. One of three members of this class (HAP2A, HAP2B, HAP2C), it is expressed in vegetative and reproductive tissues., Encodes a subunit of CCAAT-binding complex, binds to CCAAT box motif present in some plant promoter sequences. One of three members of this class (HAP2A, HAP2B, HAP2C), it is expressed in vegetative and reproductive tissues., Encodes a subunit of CCAAT-binding complex, binds to CCAAT box motif present in some plant promoter sequences. One of three members of this class (HAP2A, HAP2B, HAP2C), it is expressed in vegetative and reproductive tissues., Encodes a subunit of CCAAT-binding complex, binds to CCAAT box motif present in some plant promoter sequences. One of three members of this class (HAP2A, HAP2B, HAP2C), it is expressed in vegetative and reproductive tissues.	AT5G12840	transcription factor activity transcription factor activity regulation of transcription, DNA-dependent embryonic development ending in seed dormancy CCAAT-binding factor complex regulation of timing of transition from vegetative to reproductive phase	1,000	10,887	0,082	0,811
100777		similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G24805.1); similar to hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:BAC75560.1); contains InterPro domain Methyltransferase FkbM; (InterPro:IPR006342)	AT5G01710	endomembrane system	-2,013	10,731	0,082	0,806
101419		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein; Identical to RING-H2 finger protein ATL1M (ATL1M) [Arabidopsis Thaliana] (GB:P0C035;GB:Q4PSZ0); similar to ATL3 (Arabidopsis T?xicos en Levadura 3), protein binding / zinc ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G72310.1); similar to Zinc finger, RING-type [Medicago truncatula] (GB:ABE92645.1); contains InterPro domain Zinc finger, RING-type; (InterPro:IPR001841)	AT1G53820	protein binding protein binding zinc ion binding zinc ion binding	-3,111	10,452	0,070	0,888

101670		similar to Hypothetical protein [Oryza sativa] (GB:AAM08779.1); similar to Os07g0185900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001059068.1)	AT3G57450	molecular_function				
				biological_process	-3,672	9,857	0,071	0,863
102436	AtRLP14	leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G25470.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G49290.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74190.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)	AT1G74180	protein binding protein binding signal transduction				
				chloroplast	-2,184	10,481	0,054	0,937
103448	anac071	ANAC071 (Arabidopsis NAC domain containing protein 71); transcription factor; similar to ANAC096 (Arabidopsis NAC domain containing protein 96), transcription factor [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G46590.1); similar to nam-like protein 11 [Petunia x hybrida] (GB:AAM34774.1); contains InterPro domain No apical meristem (NAM) protein; (InterPro:IPR003441)	AT4G17980	transcription factor activity cellular_component multicellular organismal development				
				regulation of transcription	-1,984	12,757	0,084	0,784
103556		CCR4-NOT transcription complex protein, putative; similar to CCR4-NOT transcription complex protein, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G22250.1); similar to CCR4 associated factor 1-related protein [Capsicum annuum] (GB:ABG66307.1); contains InterPro domain Ribonuclease CAF1; (InterPro:IPR006941); contains InterPro domain Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold; (InterPro:IPR012337)	AT3G44260	nucleic acid binding ribonuclease activity nucleus RNA modification response to biotic stimulus				
				response to wounding	-2,240	11,424	0,054	0,942

104101	ATWRKY70, WRKY70	member of WRKY Transcription Factor; Group III. Function as activator of SA-dependent defense genes and a repressor of JA-regulated genes. WRKY70-controlled suppression of JA-signaling is partly executed by NPR1., member of WRKY Transcription Factor; Group III. Function as activator of SA-dependent defense genes and a repressor of JA-regulated genes. WRKY70-controlled suppression of JA-signaling is partly executed by NPR1.	AT3G56400	transcription factor activity transcription factor activity nucleus regulation of transcription, DNA-dependent response to jasmonic acid stimulus indole glucosinolate biosynthetic process systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway camalexin biosynthetic process response to chitin transcription repressor activity regulation of defense response defense response to bacterium defense response to fungus	-2,218	12,813	0,082	0,801
104614		disease resistance protein (NBS-LRR class), putative; Identical to Putative disease resistance protein At3g14460 [Arabidopsis thaliana] (GB:Q9LRR5); similar to disease resistance protein (NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G14470.1); similar to NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa] (GB:ABF81420.1); contains InterPro domain NB-ARC; (InterPro:IPR002182); contains InterPro domain Disease resistance protein; (InterPro:IPR000767); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611)	AT3G14460	protein binding ATP binding apoptosis defense response	-1,693	11,379	0,023	0,989
105663	ATL2	RING-H2 protein induced after exposure to chitin or inactivated crude cellulase preparations.	AT3G16720	protein binding protein binding defense response zinc ion binding zinc ion binding response to chitin	-3,078	11,145	0,052	0,950

108707	ATP5CS, P5CS1	encodes a delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase that catalyzes the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of proline. Gene is expressed in reproductive organs and tissues under non-stress conditions but in the whole plant under water-limiting condition. Expression is also induced by abscisic acid and salt stress in a light-dependent manner., encodes a delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase that catalyzes the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of proline. Gene is expressed in reproductive organs and tissues under non-stress conditions but in the whole plant under water-limiting condition. Expression is also induced by abscisic acid and salt stress in a light-dependent manner.	AT2G39800	cytoplasm proline biosynthetic process proline biosynthetic process response to oxidative stress response to desiccation response to water deprivation chloroplast response to salt stress response to abscisic acid stimulus membrane delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase activity hyperosmotic salinity response hyperosmotic salinity response root development	1,451	10,223	0,065	0,924
109540		Encodes a sesquiterpene synthase involved in generating all of the group A sesquiterpenes found in the Arabidopsis floral volatile blend. Strongly expressed in the stigma.	AT5G23960	cellular_component sesquiterpenoid biosynthetic process sesquiterpene biosynthetic process	2,549	8,229	0,070	0,895
111204		similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G52710.1); similar to Os11g0153300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001065777.1); similar to calcium/calmodulin protein kinase 1 [Nicotiana tabacum] (GB:AAN71903.1)	AT2G36220	molecular_function cellular_component biological_process	-1,662	12,610	0,087	0,772
113180		calmodulin-related protein, putative; Identical to Calmodulin-like protein 41 (CML41) [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q8L3R2;GB:Q9SVM1); similar to calcium-binding EF hand family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G76650.1); similar to calmodulin-like protein [Musa acuminata] (GB:AAL06347.1); contains InterPro domain EF-Hand type; (InterPro:IPR011992); contains InterPro domain Calcium-binding EF-hand; (InterPro:IPR002048)	AT3G50770	calcium ion binding calcium ion binding biological_process chloroplast	-1,711	7,949	0,082	0,797

113250	ATTPS14, TPS14	terpene synthase/cyclase family protein; similar to lyase/ magnesium ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G16730.1); similar to 24349 (GB:AAD21414.1); contains InterPro domain Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid; (InterPro:IPR008930); contains InterPro domain Terpenoid synthase; (InterPro:IPR008949); contains InterPro domain Terpene synthase, metal-binding; (InterPro:IPR005630); contains InterPro domain Terpene synthase-like; (InterPro:IPR001906), terpene synthase/cyclase family protein; similar to lyase/ magnesium ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G16730.1); similar to 24349 (GB:AAD21414.1); contains InterPro domain Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid; (InterPro:IPR008930); contains InterPro domain Terpenoid synthase; (InterPro:IPR008949); contains InterPro domain Terpene synthase, metal-binding; (InterPro:IPR005630); contains InterPro domain Terpene synthase-like; (InterPro:IPR001906)	AT1G61680	plastid S-linalool synthase activity monoterpene biosynthetic process	2,585	5,923	0,052	0,952
113473	ATTPS14, TPS14	terpene synthase/cyclase family protein; similar to lyase/ magnesium ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G16730.1); similar to 24349 (GB:AAD21414.1); contains InterPro domain Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid; (InterPro:IPR008930); contains InterPro domain Terpenoid synthase; (InterPro:IPR008949); contains InterPro domain Terpene synthase, metal-binding; (InterPro:IPR005630); contains InterPro domain Terpene synthase-like; (InterPro:IPR001906), terpene synthase/cyclase family protein; similar to lyase/ magnesium ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G16730.1); similar to 24349 (GB:AAD21414.1); contains InterPro domain Terpenoid cyclases/protein prenyltransferase alpha-alpha toroid; (InterPro:IPR008930); contains InterPro domain Terpenoid synthase; (InterPro:IPR008949); contains InterPro domain Terpene synthase, metal-binding; (InterPro:IPR005630); contains InterPro domain Terpene synthase-like; (InterPro:IPR001906)	AT1G61680	plastid S-linalool synthase activity monoterpene biosynthetic process	2,063	8,865	0,020	0,995
113508		myosin heavy chain-related	AT4G03620	molecular_function response to cyclopentenone	1,080	9,279	0,076	0,827

113550		similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G37240.1); similar to TMV response-related gene product [Nicotiana tabacum] (GB:BAB41200.1); similar to hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:BAC83793.1)	AT2G23690	molecular_function cellular_component N-terminal protein myristoylation	-3,225	9,243	0,076	0,831
113927	AtRLP21	leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74180.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G49290.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74190.1); similar to Os04g0647900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001054072.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)	AT2G25470	protein binding protein binding signal transduction chloroplast	-1,726	11,009	0,070	0,886
113945	SCL13	Encodes a scarecrow-like protein (SCL13). Member of GRAS gene family.	AT4G17230	transcription factor activity response to chitin regulation of transcription	-1,271	11,938	0,075	0,850
115051		peroxidase, putative; Identical to Peroxidase 58 precursor (EC 1.11.1.7) (Atperox P58) (ATP42) (PER58) [Arabidopsis Thaliana] (GB:P59120); similar to peroxidase, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G06720.1); similar to peroxidase [Solanum lycopersicum] (GB:CAA50597.1); contains InterPro domain Haem peroxidase; (InterPro:IPR010255); contains InterPro domain Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial; (InterPro:IPR002016); contains InterPro domain Plant peroxidase; (InterPro:IPR000823)	AT5G19880	peroxidase activity peroxidase activity N-terminal protein myristoylation response to oxidative stress electron carrier activity response to virus response to ethylene stimulus endomembrane system heme binding	2,088	7,791	0,082	0,799
115238		F-box family protein; similar to F-box family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G46170.1); similar to P0432B10.4 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:BAB90386.1); similar to Os05g0510400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001056009.1); similar to Os01g0770400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001044377.1); contains InterPro domain Cyclin-like F-box; (InterPro:IPR001810)	AT1G30200	molecular_function cellular_component biological_process	-3,092	10,854	0,087	0,775

116338	ATWRKY53, WRKY53	member of WRKY Transcription Factor; Group III, member of WRKY Transcription Factor; Group III	AT4G23810	DNA binding transcription factor activity transcription factor activity protein binding nucleus regulation of transcription, DNA-dependent chloroplast defense response to bacterium, incompatible interaction response to chitin transcription activator activity regulation of defense response positive regulation of transcription	-2,550	13,204	0,079	0,821
117487	TAR2	alliinase family protein; similar to alliinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G23320.1); similar to Allinase EGF-like; Allinase, C-terminal [Medicago truncatula] (GB:ABE79686.1); contains InterPro domain Allinase, C-terminal; (InterPro:IPR006948)	AT4G24670	indoleacetic acid biosynthetic process response to ethylene stimulus embryonic development ending in seed dormancy flower development positive gravitropism maintenance of root meristem identity phloem or xylem histogenesis cotyledon vascular tissue pattern formation endomembrane system carbon-sulfur lyase activity shoot system development gynoecium development cotyledon development L-tryptophan:2-oxoglutarate aminotransferase activity	1,498	7,708	0,075	0,846

		leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G25470.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74180.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74170.1); similar to Os04g0647900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001054072.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)		protein binding protein binding signal transduction				
117751	AtRLP15		AT1G74190	endomembrane system	-2,192	10,964	0,070	0,881
		leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G25470.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74180.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74190.1); similar to Os04g0647900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001054072.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, typical subtype; (InterPro:IPR003591); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090)		protein binding protein binding				
117782	AtRLP45		AT3G53240	signal transduction	-2,570	9,736	0,023	0,987
		similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G03280.1); similar to conserved hypothetical protein [Medicago truncatula] (GB:ABE92227.1); contains InterPro domain TGS-like; (InterPro:IPR012676)		molecular_function cellular_component				
118421			AT5G17350	N-terminal protein myristoylation	-3,153	11,022	0,054	0,944
		U-box domain-containing protein; similar to U-box domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G35930.1); similar to U-box protein [Capsicum annuum] (GB:ABA59556.1); contains InterPro domain Armadillo-like helical; (InterPro:IPR011989); contains InterPro domain U box; (InterPro:IPR003613)		respiratory burst involved in defense response ubiquitin-protein ligase activity cytosol defense response response to water deprivation response to chitin protein ubiquitination				
119807	PUB22		AT3G52450		-3,335	10,666	0,075	0,847

119954	ATWRKY40, WRKY40	Pathogen-induced transcription factor. Binds W-box sequences in vitro. Forms protein complexes with itself and with WRKY40 and WRKY60. Coexpression with WRKY18 or WRKY60 made plants more susceptible to both <i>P. syringae</i> and <i>B. cinerea</i> . WRKY18, WRKY40, and WRKY60 have partially redundant roles in response to the hemibiotrophic bacterial pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> and the necrotrophic fungal pathogen <i>Botrytis cinerea</i> , with WRKY18 playing a more important role than the other two., Pathogen-induced transcription factor. Binds W-box sequences in vitro. Forms protein complexes with itself and with WRKY40 and WRKY60. Coexpression with WRKY18 or WRKY60 made plants more susceptible to both <i>P. syringae</i> and <i>B. cinerea</i> . WRKY18, WRKY40, and WRKY60 have partially redundant roles in response to the hemibiotrophic bacterial pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> and the necrotrophic fungal pathogen <i>Botrytis cinerea</i> , with WRKY18 playing a more important role than the other two.	AT1G80840	transcription factor activity transcription factor activity protein binding nucleus regulation of transcription, DNA-dependent response to wounding response to salicylic acid stimulus response to chitin regulation of defense response defense response to bacterium regulation of defense response to virus by host	-2,333	13,369	0,054	0,939
120306	GATL10	Encodes a protein with putative galacturonosyltransferase activity.	AT3G28340	endomembrane system carbohydrate biosynthetic process transferase activity, transferring hexosyl groups polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase activity	-3,905	11,115	0,049	0,963
120352		ethylene-responsive protein, putative; similar to ethylene-responsive protein, putative [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:AT2G31730.1); similar to ER33 protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>] (GB:AAD46413.1); contains InterPro domain Helix-loop-helix DNA-binding; (InterPro:IPR011598); contains InterPro domain Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH; (InterPro:IPR001092)	AT1G05710	transcription factor activity nucleus response to ethylene stimulus regulation of transcription	-2,901	6,885	0,052	0,958

124183		disease resistance protein (NBS-LRR class), putative; Identical to Putative disease resistance protein At3g14460 [Arabidopsis thaliana] (GB:Q9LRR5); similar to disease resistance protein (NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G14470.1); similar to NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa] (GB:ABF81420.1); contains InterPro domain NB-ARC; (InterPro:IPR002182); contains InterPro domain Disease resistance protein; (InterPro:IPR000767); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611)	AT3G14460	protein binding ATP binding apoptosis defense response	-2,295	11,083	0,052	0,948
127562		disease resistance protein (NBS-LRR class), putative; Identical to Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (RPPL1) [Arabidopsis thaliana] (GB:Q9LRR4); similar to disease resistance protein (NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G14460.1); similar to NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa] (GB:ABF81420.1); similar to Disease resistance protein; Peptidase aspartic, active site [Medicago truncatula] (GB:ABE86891.1); similar to Disease resistance protein; GTP-binding signal recognition particle SRP54, G-domain [Medicago truncatula] (GB:ABE84395.1); contains InterPro domain NB-ARC; (InterPro:IPR002182); contains InterPro domain Disease resistance protein; (InterPro:IPR000767); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611)	AT3G14470	protein binding apoptosis defense response endomembrane system	-1,876	11,844	0,020	0,992
127726	ATPUB29, PUB29	U-box domain-containing protein; similar to U-box domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G09800.1); similar to U box [Medicago truncatula] (GB:ABE81171.1); contains InterPro domain Armadillo-like helical; (InterPro:IPR011989); contains InterPro domain U box; (InterPro:IPR003613), U-box domain-containing protein; similar to U-box domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G09800.1); similar to U box [Medicago truncatula] (GB:ABE81171.1); contains InterPro domain Armadillo-like helical; (InterPro:IPR011989); contains InterPro domain U box; (InterPro:IPR003613)	AT3G18710	ubiquitin ligase complex ubiquitin-protein ligase activity response to chitin protein ubiquitination	-2,239	11,640	0,071	0,867

129863	AtRLP15	leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G25470.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74180.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74170.1); similar to Os04g0647900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001054072.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)	AT1G74190	protein binding protein binding signal transduction endomembrane system	-1,791	9,202	0,084	0,784
200360	AtRLP14	leucine-rich repeat family protein; similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G25470.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G49290.1); similar to leucine-rich repeat family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G74190.1); similar to H0821G03.8 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:CAJ86057.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)	AT1G74180	protein binding protein binding signal transduction chloroplast	-2,094	8,478	0,098	0,750

200839	ATPUMP5, UCP5	mitochondrial substrate carrier family protein; similar to mitochondrial substrate carrier family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G24570.1); similar to putative mitochondrial dicarboxylate carrier protein [Trifolium pratense] (GB:BAE71294.1); contains InterPro domain Adenine nucleotide translocator 1; (InterPro:IPR002113); contains InterPro domain Mitochondrial carrier protein; (InterPro:IPR002067); contains InterPro domain Mitochondrial substrate carrier; (InterPro:IPR001993); contains InterPro domain Mitochondrial brown fat uncoupling protein; (InterPro:IPR002030), mitochondrial substrate carrier family protein; similar to mitochondrial substrate carrier family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G24570.1); similar to putative mitochondrial dicarboxylate carrier protein [Trifolium pratense] (GB:BAE71294.1); contains InterPro domain Adenine nucleotide translocator 1; (InterPro:IPR002113); contains InterPro domain Mitochondrial carrier protein; (InterPro:IPR002067); contains InterPro domain Mitochondrial substrate carrier; (InterPro:IPR001993); contains InterPro domain Mitochondrial brown fat uncoupling protein; (InterPro:IPR002030)	AT2G22500	dicarboxylic acid transmembrane transporter activity binding mitochondrion mitochondrial inner membrane transport mitochondrial transport mitochondrial transport	-4,705	11,466	0,070	0,883
202767		disease resistance protein (NBS-LRR class), putative; Identical to Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (RPPL1) [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q9LRR4); similar to disease resistance protein (NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G14460.1); similar to NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa] (GB:ABF81420.1); similar to Disease resistance protein; Peptidase aspartic, active site [Medicago truncatula] (GB:ABE86891.1); similar to Disease resistance protein; GTP-binding signal recognition particle SRP54, G-domain [Medicago truncatula] (GB:ABE84395.1); contains InterPro domain NB-ARC; (InterPro:IPR002182); contains InterPro domain Disease resistance protein; (InterPro:IPR000767); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611)	AT3G14470	protein binding apoptosis defense response	-1,234	11,024	0,082	0,794

203032		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein; Identical to RING-H2 finger protein ATL5H precursor (ATL5H) [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q8LGA5); similar to ATL6 (Arabidopsis T?xicos en Levadura 6), protein binding / zinc ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G05200.1); similar to RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein [Cucumis melo] (GB:AAO45753.1); contains InterPro domain Zinc finger, RING-type; (InterPro:IPR001841)	AT5G27420	ubiquitin-protein ligase activity protein binding zinc ion binding response to abscisic acid stimulus response to chitin membrane cellular response to nitrogen levels	-1,962	12,858	0,070	0,907
206253	ago/02	An Argonaute gene	AT1G31280	nucleic acid binding cellular_component biological_process	-1,803	10,180	0,082	0,795
207025	ATL2	RING-H2 protein induced after exposure to chitin or inactivated crude cellulase preparations.	AT3G16720	protein binding protein binding defense response zinc ion binding zinc ion binding response to chitin	-2,690	10,637	0,098	0,747
208377		zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein; Identical to RING-H2 finger protein ATL1M (ATL1M) [Arabidopsis Thaliana] (GB:P0C035;GB:Q4PSZ0); similar to ATL3 (Arabidopsis T?xicos en Levadura 3), protein binding / zinc ion binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G72310.1); similar to Zinc finger, RING-type [Medicago truncatula] (GB:ABE92645.1); contains InterPro domain Zinc finger, RING-type; (InterPro:IPR001841)	AT1G53820	protein binding protein binding zinc ion binding zinc ion binding	-3,254	9,914	0,075	0,843
209162		CCR4-NOT transcription complex protein, putative; similar to CCR4-NOT transcription complex protein, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G44260.1); similar to CCR4 associated factor 1-related protein [Capsicum annuum] (GB:ABG66307.1); contains InterPro domain Ribonuclease CAF1; (InterPro:IPR006941); contains InterPro domain Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold; (InterPro:IPR012337)	AT5G22250	nucleic acid binding ribonuclease activity nucleus RNA modification	-2,471	12,711	0,070	0,904

209506		protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein; similar to protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G23770.1); similar to Os02g0193000 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001046166.1); similar to Os06g0625300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001058111.1); similar to Protein kinase domain containing protein, expressed [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:ABA94286.1); contains InterPro domain Protein kinase-like; (InterPro:IPR011009); contains InterPro domain Protein kinase; (InterPro:IPR000719); contains InterPro domain Peptidoglycan-binding LysM; (InterPro:IPR002482)	AT2G33580	plasma membrane protein amino acid phosphorylation kinase activity cell wall macromolecule catabolic process	-1,573	13,078	0,070	0,914
209689		ChaC-like family protein; similar to ChaC-like family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G31290.1); similar to ChaC-like family protein-like [Solanum tuberosum] (GB:ABB87104.1); similar to meloidogyne-induced (GB:ABA46779.1); contains InterPro domain ChaC-like protein; (InterPro:IPR006840)	AT5G26220	molecular_function cellular_component response to lead ion response to cadmium ion	-4,603	10,854	0,082	0,795

210351	AtRLP30	disease resistance family protein / LRR family protein; similar to disease resistance family protein / LRR family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G71390.1); similar to disease resistance family protein / LRR family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G71400.1); similar to disease resistance family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G05370.1); similar to Hcr9-Avr4-ch11 [Lycopersicon chilense] (GB:AAV41387.1); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Leucine rich repeat, N-terminal; (InterPro:IPR013210)	AT3G05360	protein binding protein binding defense response signal transduction defense response signaling pathway, resistance gene-independent endomembrane system kinase activity	-1,851	10,063	0,075	0,849
210413		leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative; similar to leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G33170.1); similar to receptor-like protein kinase [Nicotiana tabacum] (GB:BAC07504.2); contains InterPro domain Protein kinase-like; (InterPro:IPR011009); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611); contains InterPro domain Protein kinase; (InterPro:IPR000719); contains InterPro domain Leucine-rich repeat, plant specific; (InterPro:IPR007090); contains InterPro domain Serine/threonine protein kinase, active site; (InterPro:IPR008271)	AT2G31880	protein serine/threonine kinase activity ATP binding plasma membrane protein amino acid phosphorylation transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway kinase activity positive regulation of defense response	-2,339	10,073	0,071	0,863
211034		protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative; similar to protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G07160.1); similar to protein phosphatase 2C [Medicago sativa] (GB:CAA72341.1); contains InterPro domain Protein phosphatase 2C; (InterPro:IPR000222); contains InterPro domain Protein phosphatase 2C-like; (InterPro:IPR001932)	AT2G30020	protein serine/threonine phosphatase activity protein serine/threonine phosphatase activity protein serine/threonine phosphatase complex chloroplast response to wounding response to fungus defense response to fungus	-2,823	12,497	0,082	0,792

211419	<p>ATSZF2, CZF1, SZF2, ZFAR1, ATSZF2, CZF1, SZF2, ZFAR1</p>	<p>CZF1/ZFAR1; similar to zinc finger (CCCH-type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55980.1); similar to Cys-3-His zinc finger protein [Capsicum annuum] (GB:ABI30334.1); contains InterPro domain Ankyrin; (InterPro:IPR002110); contains InterPro domain Zinc finger, CCCH-type; (InterPro:IPR000571), CZF1/ZFAR1; similar to zinc finger (CCCH-type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55980.1); similar to Cys-3-His zinc finger protein [Capsicum annuum] (GB:ABI30334.1); contains InterPro domain Ankyrin; (InterPro:IPR002110); contains InterPro domain Zinc finger, CCCH-type; (InterPro:IPR000571), CZF1/ZFAR1; similar to zinc finger (CCCH-type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55980.1); similar to Cys-3-His zinc finger protein [Capsicum annuum] (GB:ABI30334.1); contains InterPro domain Ankyrin; (InterPro:IPR002110); contains InterPro domain Zinc finger, CCCH-type; (InterPro:IPR000571), CZF1/ZFAR1; similar to zinc finger (CCCH-type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55980.1); similar to Cys-3-His zinc finger protein [Capsicum annuum] (GB:ABI30334.1); contains InterPro domain Ankyrin; (InterPro:IPR002110); contains InterPro domain Zinc finger, CCCH-type; (InterPro:IPR000571), CZF1/ZFAR1; transcription factor; similar to zinc finger (CCCH-type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55980.1); similar to Cys-3-His zinc finger protein [Capsicum annuum] (GB:ABI30334.1)</p>	AT2G40140	<p>transcription factor activity cellular_component response to cold response to chitin regulation of transcription</p> <p>defense response to fungus</p>	-1,614	13,830	0,075	0,853
--------	---	--	-----------	---	--------	--------	-------	-------

216289		disease resistance protein (NBS-LRR class), putative; Identical to Putative disease resistance RPP13-like protein 1 (RPPL1) [Arabidopsis thaliana] (GB:Q9LRR4); similar to disease resistance protein (NBS-LRR class), putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G14460.1); similar to NBS type disease resistance protein [Populus trichocarpa] (GB:ABF81420.1); similar to Disease resistance protein; Peptidase aspartic, active site [Medicago truncatula] (GB:ABE86891.1); similar to Disease resistance protein; GTP-binding signal recognition particle SRP54, G-domain [Medicago truncatula] (GB:ABE84395.1); contains InterPro domain NB-ARC; (InterPro:IPR002182); contains InterPro domain Disease resistance protein; (InterPro:IPR000767); contains InterPro domain Leucine-rich repeat; (InterPro:IPR001611)	AT3G14470	protein binding apoptosis defense response endomembrane system	-1,464	12,543	0,082	0,814
300061		transferase family protein; similar to transferase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G29635.1); similar to AT5g39050/MXF12_60 [Medicago truncatula] (GB:ABE91277.1); contains InterPro domain Transferase; (InterPro:IPR003480)	AT3G29670	cellular_component biological_process transferase activity transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	-1,805	11,477	0,070	0,892
300665	PBF1	Encodes 20S proteasome beta subunit PBF1 (PBF1).	AT3G60820	proteasome core complex plasma membrane ubiquitin-dependent protein catabolic process peptidase activity chloroplast	-3,010	10,781	0,075	0,842
300884		protein kinase family protein; similar to protein kinase family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G54610.1); similar to Os01g0367700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001043043.1); similar to Protein kinase [Medicago truncatula] (GB:ABE89394.1); similar to putative CRK1 protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:BAD89473.1); contains InterPro domain Serine/threonine protein kinase; (InterPro:IPR002290); contains InterPro domain Protein kinase-like; (InterPro:IPR011009); contains InterPro domain Protein kinase; (InterPro:IPR000719); contains InterPro domain Serine/threonine protein kinase, active site; (InterPro:IPR008271)	AT5G50860	protein kinase activity protein kinase activity protein serine/threonine kinase activity ATP binding plasma membrane protein amino acid phosphorylation N-terminal protein myristoylation	-2,368	13,094	0,071	0,869

301401	seven in absentia (SINA) family protein; Identical to E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3 (EC 6.3.2.-) (Seven in absentia homolog 3) (SINAT3) [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q84JL3;GB:Q8LFFQ3;GB:Q9M359); similar to seven in absentia (SINA) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G27880.1); similar to Zinc finger, RING-type; Seven in absentia protein [Medicago truncatula] (GB:ABE82758.1); contains InterPro domain TRAF-like; (InterPro:IPR008974); contains InterPro domain Seven in absentia protein; (InterPro:IPR004162); contains InterPro domain TRAF-type; (InterPro:IPR013322); contains InterPro domain SIAH-type; (InterPro:IPR013323); contains InterPro domain Zinc finger, SIAH-type; (InterPro:IPR013010); contains InterPro domain Zinc finger, RING-type; (InterPro:IPR001841)	AT3G61790	ubiquitin-protein ligase activity protein binding nucleus nucleus ubiquitin-dependent protein catabolic process ubiquitin-dependent protein catabolic process multicellular organismal development multicellular organismal development zinc ion binding protein ubiquitination	-2,897	13,035	0,100	0,740
302363	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase, chloroplast / 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase; Identical to 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase, chloroplast precursor (EC 1.1.1.100) (3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase) [Arabidopsis Thaliana] (GB:P33207;GB:O04463;GB:Q9FPJ6); similar to tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G29370.1); similar to 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase 1, chloroplast precursor (3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase 1) (Beta-keto acyl-carrier protein reductase 1) (GB:Q93X62); contains InterPro domain Short-chain dehydrogenase/reductase SDR; (InterPro:IPR002198); contains InterPro domain 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase; (InterPro:IPR011284); contains InterPro domain Glucose/ribitol dehydrogenase; (InterPro:IPR002347)	AT1G24360	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase activity copper ion binding fatty acid biosynthetic process metabolic process chloroplast chloroplast stroma chloroplast envelope	-1,987	13,705	0,098	0,749
304264	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G36220.1); similar to Os11g0153300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001065777.1)	AT3G52710	molecular_function plasma membrane biological_process	-2,927	11,392	0,083	0,790
304931	similar to hypothetical protein MtrDRAFT_AC148171g2v1 [Medicago truncatula] (GB:ABE89789.1)	AT1G65230	molecular_function biological_process chloroplast	1,114	8,679	0,089	0,767

305138	LON2	Lon protease homolog 1, mitochondrial (LON); Identical to Lon protease homolog 1, mitochondrial precursor (EC 3.4.21.-) (LON) [Arabidopsis thaliana] (GB:O64948); similar to LON_ARA_ARA (Lon protease homolog gene), ATP binding / ATP-dependent peptidase/ serine-type peptidase [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G26860.1); similar to Lon protease homolog 1, mitochondrial precursor (GB:P93647); similar to Lon protease [Dichantheium lanu (GB:AAK62365.1); similar to Lon protease [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (GB:AAM95459.1); contains InterPro domain Peptidase S16, active site; (InterPro:IPR008268); contains InterPro domain Peptidase S16, lon C-terminal; (InterPro:IPR008269); contains InterPro domain Peptidase S16, lon N-terminal; (InterPro:IPR003111); contains InterPro domain AAA ATPase; (InterPro:IPR003593); contains InterPro domain Chaperonin clpA/B; (InterPro:IPR001270); contains InterPro domain Peptidase S16, ATP-dependent protease La; (InterPro:IPR004815); contains InterPro domain Peptidase S16, lon protease; (InterPro:IPR001984); contains InterPro domain AAA ATPase, central region; (InterPro:IPR003959)	AT5G47040	nucleotide binding serine-type endopeptidase activity ATP binding ATP binding peroxisome serine-type peptidase activity protein import into peroxisome matrix, docking nucleoside-triphosphatase activity growth organelle lumen	-1,969	13,384	0,071	0,864
306758	CRK6	Arabidopsis thaliana receptor-like protein kinase. Naming convention from Chen <i>et al</i> 2003 (PMID 14756307)	AT4G23140	plasma membrane protein amino acid phosphorylation kinase activity	-4,495	10,735	0,020	0,993
308474	ATCYSD2	Encodes cysteine synthase AtcysD2.	AT5G28020	cysteine synthase activity cysteine synthase activity cysteine biosynthetic process from serine metabolic process cysteine biosynthetic process	-5,547	8,804	0,098	0,745
308776		DNA-binding family protein; similar to DNA-binding family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G63480.1); similar to HMG-I and HMG-Y, DNA-binding [Medicago truncatula] (GB:ABE92131.1); similar to DNA-binding protein PD1 [Pisum sativum] (GB:CAA67290.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF296; (InterPro:IPR005175); contains InterPro domain HMG-I and HMG-Y, DNA-binding; (InterPro:IPR000637)	AT1G63470	DNA binding DNA binding cellular_component biological_process	2,229	9,274	0,032	0,979

308831		RNA polymerase transcriptional regulation mediator-related; similar to Os06g0217500 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001057150.1); similar to PREDICTED: similar to Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (S. cerevisiae) [Strongylocentrotus purpuratus] (GB:XP_787850.1); contains InterPro domain MED6 mediator; (InterPro:IPR007018)	AT3G21350	nucleus transcription regulator activity regulation of transcription	-3,426	8,853	0,037	0,975
309986	VHA-A1	Vacuolar proton ATPase subunit VHA-a isoform 1. Localized in the trans-Golgi network.	AT2G28520	vacuole trans-Golgi network transport vesicle membrane ATP synthesis coupled proton transport ATPase activity	-2,153	11,068	0,075	0,835
311443	AtRABH1e	AtRABH1e (Arabidopsis Rab GTPase homolog H1e); GTP binding; similar to AtRABH1d (Arabidopsis Rab GTPase homolog H1d), GTP binding [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G22290.1); similar to 80A08_22 [Brassica rapa subsp. pekinensis] (GB:AAZ67607.1); contains InterPro domain Small GTP-binding protein domain; (InterPro:IPR005225); contains InterPro domain Ras small GTPase, Rab type; (InterPro:IPR003579); contains InterPro domain Ras GTPase; (InterPro:IPR001806); contains InterPro domain Ras; (InterPro:IPR013753)	AT5G10260	GTP binding GTP binding small GTPase mediated signal transduction protein transport	-3,442	8,531	0,070	0,916
311794		cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative; similar to mannitol dehydrogenase, putative [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G39330.1); similar to Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing; D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD-binding [Medicago truncatula] (GB:ABE84701.1); contains InterPro domain GroES-like; (InterPro:IPR011032); contains InterPro domain Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing; (InterPro:IPR002085); contains InterPro domain Alcohol dehydrogenase, zinc-binding; (InterPro:IPR013149); contains InterPro domain Alcohol dehydrogenase, zinc-containing; (InterPro:IPR002328); contains InterPro domain D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD-binding; (InterPro:IPR006140); contains InterPro domain Alcohol dehydrogenase GroES-like; (InterPro:IPR013154)	AT1G72680	catalytic activity binding zinc ion binding lignin biosynthetic process oxidoreductase activity oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor cofactor binding	-3,375	11,622	0,076	0,829

312344		serine carboxypeptidase S28 family protein; similar to serine carboxypeptidase S28 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G65760.1); similar to serine carboxypeptidase S28 family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G24280.1); similar to hypothetical protein LOC780095 [Xenopus tropicalis] (GB:NP_001072639.1); similar to Os01g0767100 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001044360.1); similar to Os06g0647400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001058206.1); contains InterPro domain Esterase/lipase/thioesterase; (InterPro:IPR000379); contains InterPro domain Peptidase S28; (InterPro:IPR008758)	AT5G22860	proteolysis peptidase activity serine-type peptidase activity endomembrane system	-4,006	9,663	0,075	0,835
312643		zinc finger (DHHC type) family protein; similar to zinc finger (DHHC type) family protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G22180.1); similar to DHHC-type zinc finger domain-containing protein -like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:BAD46102.1); similar to Os08g0556400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:NP_001062475.1); contains InterPro domain Zinc finger, DHHC-type; (InterPro:IPR001594)	AT4G15080	plasma membrane biological_process zinc ion binding	2,798	8,520	0,020	0,993

ANEXO 2

Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite-Virus Pathosystem

Artigo publicado na Plant Disease, 94:284–292 (2010).

Citrus Leprosis: Centennial of an Unusual Mite-Virus Pathosystem

Marinês Bastianel¹, Valdenice M. Novelli¹, Elliot W. Kitajima², Karen S. Kubo¹, Renato B. Bassanezi³, Marcos A. Machado¹ & Juliana Freitas-Astúa^{1,4}

¹Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Instituto Agronômico de Campinas, CP 04, 13490-970, Cordeirópolis, SP, Brazil; ²NAP-MEPA, ESALQ/USP, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil. ³Departamento Científico, Fundecitrus, CP 391, 14807-040, Araraquara, SP, Brazil; ⁴Embrapa Cassava and Tropical Fruits, R. Embrapa, s/nº, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil.

Corresponding author: Juliana Freitas-Astúa, e-mail: jfastua@centrodecitricultura.br

ABSTRACT

Citrus leprosis is one of the most economically important diseases of the Brazilian citrus industry. It is characterized by the presence of local lesions on fruits, leaves, and twigs or branches, which directly reduce production and life span of citrus plants. The etiologic agent is the Citrus leprosis virus C (CiLV-C) transmitted by tenuipalpid mites of the genus *Brevipalpus*. Every year, control of the vector mite costs around \$80 million (US dollars) to the growers in that country. This disease was originally described from the State of Florida in the United States over a hundred years ago, and was found later in Paraguay, Uruguay, and Brazil, where it is endemic. Recently, CiLV-C was detected in Bolivia, Venezuela, and Colombia, and it is spreading northward through the Central American countries Panama, Costa Rica, Nicaragua, Guatemala, Honduras, El Salvador, and Mexico.

This proximity and the potential damage that it can cause concerns the USA, where the disease has not been observed since the 1960's, and the Caribbean islands, which are still leprosis-free. Until recently, one of the problems for citrus leprosis management was diagnosis, which has been based only on symptoms. That could be misleading, because other pests and pathogens may cause lesions similar to those associated with leprosis. For the same reason, reports of the disease in countries in Asia and Africa must be reviewed. If the presence of CiLV-C on the Asian and African continents is not confirmed, then citrus leprosis has been limited to the American continents. The use of the electron microscopy and, more recently, the development of molecular tools increased the precision and reliability of CiLV-C detection. Hence, many of the old reports of citrus leprosis in different areas of Brazil could be confirmed, expanding the known area of occurrence. Today, citrus leprosis is confirmed throughout Brazil, indicating the need for management in commercial orchards. Other countries where the virus is also confirmed need management strategies as well. Where the disease is not yet reported, there is a need to avoid its introduction. In this review, historical details and new information on citrus leprosis dispersion and its geographic distribution are brought together from numerous reports.

Key-words: Citrus leprosis virus C, incidence of citrus leprosis

First reports

Citrus leprosis was first reported from Florida in the beginning of the twentieth century, where it was initially called scaly bark because of the characteristic stem lesions and bark scaling symptoms. The disease was also named nail head rust because of the typical lesions on the fruits and stems [Fawcett, 1907; 1911 cf. Rodrigues *et al.* (80)]. In 1926, the disease was called leprosis by Fawcett and Lee (8). In South America, citrus leprosis was reported for the first time from Paraguay by

Spegazzini (90), and it was initially named “lepra explosiva”. Around 1930, “lepra explosiva” was considered the same disease reported from Florida (29). Soon after the report from Paraguay, leprosis was observed in Argentina and Uruguay (7). Bitancourt (8) cited in his review that there was an interception of suspect material from Bolivia by the USA quarantine service; however, the official report of the presence of leprosis in that country was made decades later (37).

There are old reports, from the beginning of the twentieth century, of the occurrence of citrus leprosis in the South of China, North of India, Ceylon, Japan, Philippines, Java, Egypt, and South Africa (8,21,29). However, further reports of the occurrence of this disease in these countries could not be found. In a comprehensive review about plant viruses from Asia, Murayama *et al.* (62) do not mention the presence of citrus leprosis. There is one unique report of leprosis in India, dated 1978 (21). It is important to note, however, that this report was based only in symptoms. If the original reports were correct, the disease might have disappeared from these places, as it probably did in Florida. It is suspected that, in Florida, adverse weather conditions associated with intensive sulfur application on citrus orchards drastically reduced the vector population and completely eliminated leprosis inoculum (20). Citrus leprosis might still occur in some of the previously reported regions, but with low economic importance through the years. Characteristic symptoms and association with the mite vector are still good indications of the presence of leprosis in a particular area; however, confirmation of the disease is obtained by cytopathology and molecular detection of the virus (4).

In Brazil, citrus leprosis has been reported since the 1930's. It was originally found in Navel sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) in 1931, in Sorocaba, Sao Paulo (6). The abundance of leaf symptoms observed in Brazil (contrary to what happened in Florida, where leprosis leaf symptoms were very rare), delayed identification of the disease, which was then called “variola”. Two years later, it was concluded that this disease was the same known as leprosis in Florida (8). Even with the variation in symptoms, Bitancourt (8) reported the disease in other citrus species such as sweet lime

(*C. limettioides* Tan.), Key lime [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle], Rangpur lime (*C. limonia* Osbeck), sour orange (*C. aurantium* L.), citron (*C. medica* L.), grapefruit (*C. paradise* Macf.), and mandarin (*C. reticulata* Blanco). Recently, many of these species were considered resistant or asymptomatic to leprosis (4, 32).

The citrus leprosis pathosystem

The etiology of citrus leprosis was initially contested. In the USA, Fawcett and Burger, in 1911 [cited by Bitancourt (8)] suggested that the disease was caused by the fungus *Cladosporium herbarium* var. *citriculum* Faw. Even before that, other fungi such as *Hysterographium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Hormodendron*, cited by Fawcett, were associated with scaly bark [cf. Rodrigues *et al.* (80)]. In Paraguay, Spegazzini (90) suggested that the causal agent of “lepra explosiva” was the fungus *Amylirosa aurantiorum* Speg. Because the disease arose in Brazil, even without the etiological agent identified, Bitancourt (8) believed that leprosis was caused by a virus, because of the symptom similarity with ring spots caused by this type of pathogen.

In Argentina, Frezzi (36) and Vergani (93) demonstrated that citrus leprosis was transmitted by the mite *Tenuipalpus pseudocuneatus* Blanch, later identified as *Brevipalpus obovatus* Donnadieu. The association of mites with the disease was confirmed in USA, and *B. californicus* Banks was identified as the vector in Florida (51, 52) and in Guatemala (74). In Brazil, Musumeci and Rossetti (63) reported the presence of *B. phoenicis* Geijskes in plants with leprosis symptoms.

With the association of *Brevipalpus* spp. and citrus leprosis, the symptoms were attributed either to toxins from the mite’s saliva (93) or to a pathogen, probably a virus, transmitted by the mite (36). In Florida, Knorr (52) demonstrated that leprosis could be transmitted through the insertion of symptomatic shoots by tip graft to healthy plants. Graft transmission of leprosis was confirmed in Brazil by Chagas and Rossetti (14). Kitajima *et al.* (49) observed the presence of bacilliform particles

associated with leprosis lesions by transmission electron microscopy (TEM), reinforcing the hypothesis that a virus was the causal agent. Finally, Colariccio *et al.* (22) obtained typical symptoms of leprosis by mechanical sap inoculation in plants of the same genera and other herbaceous plants (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *C. quinoa* Wild. and *Gomphrena globosa* L.), proving the viral cause of leprosis.

Leprosis involves symptoms in citrus leaves, stems, and fruits, which may vary according to the host species, the stage of the development of the plant, and the pathogen isolates (84) (Figure 1). Typical lesions are chlorotic or necrotic, varying in color from light yellow to dark brown, and are often circular with diameter ranging from 5 to 12 mm, localized only on the feeding sites of the mite vector. Sometimes, it is possible to observe a darker central point in older lesions and ring spots may also occur. Particularly when manifested under high temperature, the center of the necrotic leaf tissue may tear apart. These symptoms exhibit a common pattern but extremely variable among citrus species and varieties (4). The disease can cause a decrease in production due to reduction in tree canopy development, premature fruit and leaf drop, and dieback. Under high inoculum conditions, it can cause the death of young susceptible plants (79).

The occurrence of virus-like particles in symptomatic leaf tissues was reported by Kitajima *et al.* (49), who did not find such particles in surrounding, asymptomatic areas. Similar results were obtained by Antonioli-Luizon and Freitas-Astúa (*unpublished data*) with RT-PCR amplification of DNA from symptomatic and adjacent asymptomatic tissues. These data show that the virus does not spread systemically in the host, and plant disease dispersion occurs through movement of viruliferous mites within the orchard, and is a consequence of their feeding habit. In symptomatic leaf tissues, bacilliform particles were found in the nuclei of infected cells and caused cytopathological effects similar to those induced by Orchid fleck virus (OFV). Later, electron dense viroplasm and shorter bacilliform particles were observed in the endoplasmic reticulum of symptomatic tissue (22, 50). This

virus has been referred to as Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) (Figure 2A), which is the prevalent form, in opposition to the one described in 1972, referred to as Citrus leprosis virus, nuclear type (CiLV-N) (80) (Figure 2B).



FIG. 1: A-C – Typical leprosis symptoms in citrus leaves, fruits, and stems caused by CiLV-C. D – Uncommon CiLV-C induced symptoms in fruits.

Recently, CiLV-C is under consideration for status as full species designated Citrus leprosis virus C by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (43). Because of this new nomenclature, we suggest that the CiLV-N should be named Citrus leprosis virus N. The CiLV-N occurs rarely, and is reported only in Boquete, Panama (26) and in some cool-weather localities in the states of Sao Paulo (Amparo, Monte Alegre do Sul, and Sao Roque), Rio Grande do Sul (Marques de Souza), and Minas Gerais (Andradas), in Brazil (13, 33, 47). Lesions caused by CiLV-N resemble those caused by CiLV-C, but tend to be smaller, with a necrotic center and a chlorotic halo (Figure 3). Ringspots, usually associated with leprosis caused by CiLV-C, are not observed in CiLV-N-infected plants (4). There is very little information available on CiLV-N, but since it does not share genomic sequences with CiLV-C, they are considered different viruses (34).

Leprosis is indeed an unusual disease. It can be caused by two completely distinct viruses with similar morphology and vector. Both CiLV-C and CiLV-N are bacilliform and transmitted by tenuipalpid mites of the *Brevipalpus* genus (Figure 2C). Few other plant viruses are transmitted by mites, and most of them are from the eryophid family. In addition, the virus does not spread systemically even in its primary host, and causes only localized lesions where particles accumulate.

These data clearly show that this is not a typical plant virus. In fact, the sequencing of the CiLV-C confirmed that it has a ss+ RNA bipartite genome, with RNA1 of 8,745 nucleotides (nt) and RNA2 of 4,986 nt. The RNA1 contains two open reading frames (ORFs) corresponding to a 286kDa protein with four domains putatively involved in replication, and a 29kDa protein that is, possibly, the coat protein. The RNA2 contains four ORFs that correspond to 15kDa, 61kDa, 32kDa and 24kDa proteins, respectively. Only the 32kDa protein has similarity with other known viral proteins, and is possibly involved in cell-to-cell movement of the virus (59). Contrary to what was assumed earlier, the virus does not belong to the *Rhabdoviridae* family (59, 74) and, according to Locali-Fabris *et al.* (59), it should be classified as the type member of a new virus genus denominated Cilevirus. This

classification has been approved by the Executive Committee of the ICTV and is awaiting ratification (43). On the other hand, the genome of OFV, another virus transmitted by *Brevipalpus* mites that accumulates in the nucleus of infected cells and considered a nuclear type of the *Brevipalpus*-transmitted viruses (BrTVs), was completely sequenced and revealed genomic sequence and organization similarities with members of the *Rhabdoviridae*. However, because of its bipartite genome, OFV was tentatively classified as the prototype of a new genus of plant viruses, Dichorhabdovirus (53). Because CiLV-N is also a BrTV that accumulates in the nucleus of infected plants and has similar morphology to OFV, it is possible that it will be classified as a species of this new genus in the future. However, to date there are no ongoing studies on this issue.

It is now known that the CiLV-C host range is significantly wider than originally supposed. Recent experiments showed transmission by viruliferous mites to *Solanum violaefolium* (81), *Phaseolus vulgaris* (39), and to several other species of the vegetation found in hedgerows and windbreaks that occur near citrus orchards (69). Additionally, the first non-citrus natural host of CiLV-C was found, the rutaceous plant *Swinglea glutinosa*, often grown in hedgerows in Colombia (54). However, at this point it is not known whether or not the alternative hosts of CiLV-C play any role in the disease epidemiology, but this subject is being addressed by our group due to the potential impact in field leprosis management.

All active stages of the *Brevipalpus* mite (larvae, protonymph, deutonymph, and adult) can acquire and inoculate the virus, which is not transovarially transmitted (15, 66). An old, unconfirmed report of transovarial transmission of CiLV by *B. obovatus* (52), associated with the detection of viral particles similar to CiLV within the bodies of viruliferous *B. phoenicis* (82), led to the hypothesis that the virus could replicate in the vector (79). However, recent studies with better preserved material did not confirm this observation, and indeed, it is suspected that the particles described were the result of fixation artifacts. On the other hand, Kitajima *et al.* (48), working with material properly preserved

and from different origins, found presumed virions between the membranes of epithelial cells of intestinal diverticulum and adjacent tissue of *B. phoenicis* that had access to leprosis lesions. Confirmation that those were indeed CiLV-C particles came from immunolocalization studies with antiserum produced against the putative capsid protein of the virus (45, 60). However, the same method did not detect in *B. phoenicis* the presence of viroplasm like the ones found in the cytoplasm of infected plants (45, 46). These data, together with data on viral titers obtained by real time PCR analyses (64, 65) indicate that CiLV-C circulates, but does not replicate, in the mite vector, weakening the hypothesis that it might be a mite virus transitioning between hosts in different taxonomic kingdoms.

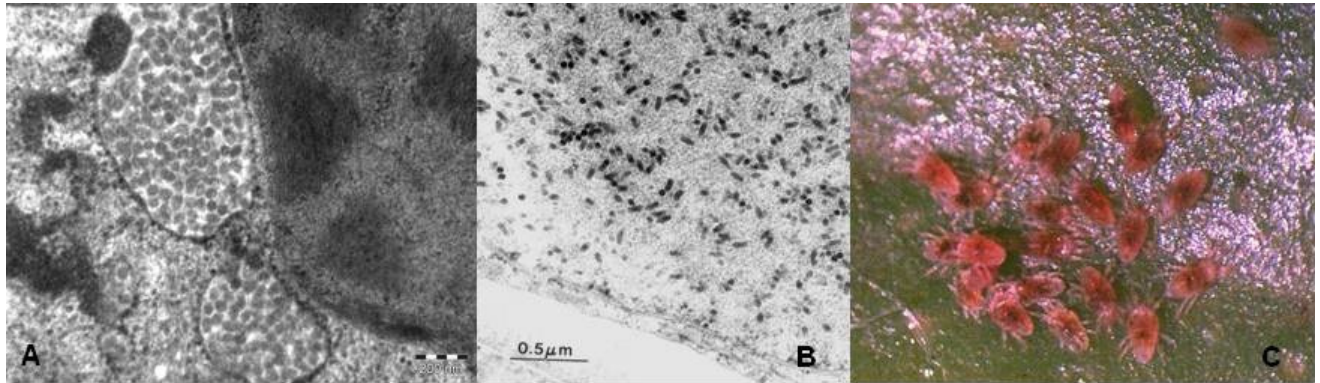


FIG. 2 – Micrographs of CiLV-C (A) and CiLV-N (B) particles transmitted by *Brevipalpus phoenicis* (C).

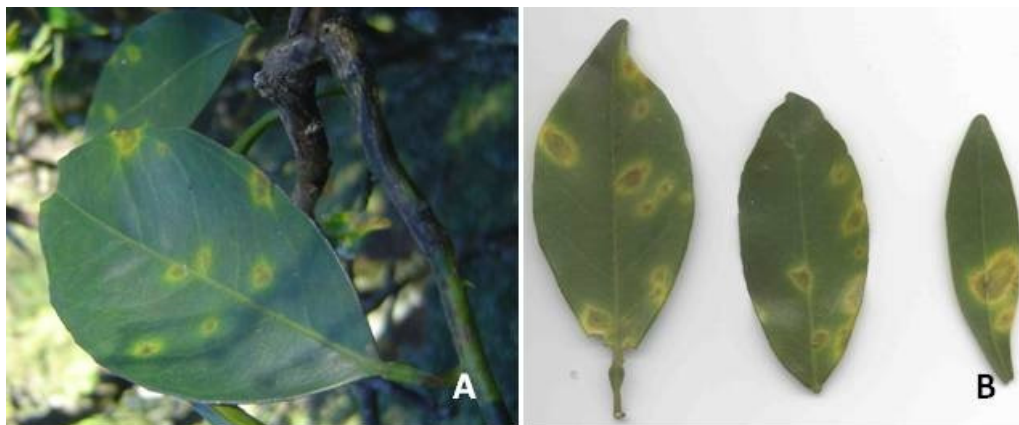


FIG. 3. Symptoms of leprosis caused by CiLV-N in citrus leaves.

Another outcome from this new information relates to the management strategy for leprosis. Currently, growers spray acaricides after an empiric threshold (often incidence of 10% of mites found in assessed fruits and branches) is reached. Field scouting is typically done every other week, with 1 to 2% of the trees inspected. Because mite population density is normally low and their distribution in the orchard is uneven, sampling is not accurate (3). In addition, the economic and environmental impacts of the use of large amounts of chemicals are high and, to certain extent, unnecessary. This is because the threshold takes into consideration the incidence of mites in the orchard, regardless the presence of the virus in the vector. Recent studies (3) showed low correlation between occurrence of mites and disease foci in the field, because only part of the mite population carries the virus. These data, together with the information that the virus does not replicate in its vector, clearly show that management recommendations for leprosis should be reviewed to include alternative measures to reduce the source of inoculum and mite population, such as pruning, and also to establish protocols to identify viruliferous mites in the field.

Leprosis distribution in Brazil

Even though the worldwide distribution of leprosis has increased recently, Brazil is by far the country where it is more important and causes more damage as the most important viral disease of citrus. This is due to an array of factors that include environmental conditions that favor the vector, which colonizes citrus throughout the year, large contiguous areas planted with highly susceptible sweet orange varieties, and the endemic presence of the virus in traditional citrus growing regions. Additionally, epidemics have been reported in years with extensive water deficit periods, which favor mite reproduction and CiLV-C spread (72), and years when citrus prices are low and discourage growers to spray with acaricides (80).

Leprosis is reported in each of the five Brazilian macro-regions where citrus is grown (Figure 4). Even though it has occurred in Brazil for almost 80 years (5, 8), leprosis is still one of the main problems of the Sao Paulo citrus industry (3), which is responsible for approximately 80% of Brazilian production (44).

In Sao Paulo, citrus leprosis is widespread (4, 86), but its incidence and severity are higher in the traditional citrus belt of the center-north and northwest regions (2). In the south and southeast of the state, newer citrus growing areas, the *Brevipalpus* mite is present, but leprosis incidence is still low (Décio Joaquim, GTACC, *personal communication*). In the 1930's, in a laborious survey of leprosis in Brazil and neighboring countries, Bitancourt (7, 8) observed symptoms of the disease in many orchards along the Uruguay river in Rio Grande do Sul State, in the state of Mato Grosso, and in the municipalities of Belém (Pará State), Ouro Preto, Lavras, Volta Grande and Itajubá (Minas Gerais State), Uruçui (Piauí State), Jacarepaguá (Rio de Janeiro State), and Crato (Ceará State).

Leprosis is found in the four states of the southeast region of Brazil. Some isolates from Rio de Janeiro seem to differ biologically with respect to symptom severity in herbaceous hosts (23). The main production area in Minas Gerais State is Triângulo Mineiro, near the north of the Sao Paulo citrus belt. And, even though leprosis is important mainly in that region of the state, the presence of CiLV-C was verified in other municipalities as well. In Minas Gerais, the citrus leprosis of the nuclear type was found in a municipality in the south of the state called Andradas (13). In Espírito Santo, the disease is also present (56), and occurs in high frequency in the whole state (Hélcio Costa, Incaper, *personal communication*) in citrus orchards that are expanding in the region.

In southern Brazil, the oldest reports of the disease are from Rio Grande do Sul (7), but currently leprosis is also found in the two other states of the region, Parana and Santa Catarina (Figure 4). In this region, which is the main Brazilian producer of fresh fruit, the disease was already reported in many localities (16, 47, 57), but without significant yield loss. In Rio Grande do Sul,

among several sampled places, an isolate of CiLV-N was found (33) in Navel sweet orange plants in a backyard planting. Since the presence of *B. phoenicis* in citrus orchards from the southern states is endemic (17, 41, 42), probably the disease is also endemic, but occurs in low incidence.

There are old reports of leprosis in the north region of Brazil (Figure 4). According to Bitancourt (8), the disease was observed in Belém do Pará in the beginning of the 1940's. Recently, Boari *et al.* (10) confirmed the occurrence of leprosis in the municipality of Capitão Poço, 210 km east from Belém, through RT-PCR and TEM. In states like Amazonas, with a rising citrus industry, the first formal report of the disease was in 2006 (35), even though some growers maintain that they have seen the symptoms in the region for several years. In general, leprosis does not cause great damage to citrus production in this state, probably due to the wide variety of natural enemies of the vector (11, 12, 71). This is because citrus is often not grown in extended areas as a monoculture, which seems to promote a balance of microfauna including pests and their natural predators.

Recent reports of citrus leprosis in the north region of Brazil were also made in the States of Tocantins (25) and Acre (31). Leprosis was also identified in at least two municipalities of the state of Roraima - Boa Vista and Alto Alegre (Halfeld-Vieira, Marsaro, Kitajima, Pereira and Freitas-Astúa, *unpublished data*). In Acre, even though citriculture is characterized by small orchards, the disease can cause severe damage with the destruction of plants severely infected by the virus (G.W. Muller, *personal communication*). Though there are no formal reports of leprosis in other states of this region, the virus may be present.

Leprosis also occurs in the Brazilian midwestern and northeastern regions (Figure 4). Though the first reports in Mato Grosso and Ceará are dated from 1940's (7), it was not until 2006 that leprosis was confirmed in Mato Grosso do Sul, in the municipality of Terenos (68). In Goiás, leprosis was reported as a concern to the citrus industry in the 1980's due to the high incidence of the vector *B. phoenicis* (92). Recently, the disease was confirmed in sweet orange and mandarin by RT-PCR in

Goiânia and Cromínia municipalities (68). In the south of Goiás State, the disease occurs mostly in orchards that are not well managed (João Meneguci, Embrapa Transferência de Tecnologia, *personal communication*). Similarly to what happens in the north of the country, leprosis should not cause significant damage to the new but fast-growing midwestern citrus industry. In Distrito Federal, where citriculture occurs in small scale, leprosis has been known since the 1980's in some orchards and in Embrapa Cerrados experimental fields (E.W. Kitajima and N.T.V. Junqueira, *unpublished data*), though there is no formal report.

Bahia and Sergipe, localized in the northeastern region of Brazil (Figure 4), are the second and third main citrus producing states, with 4.7 and 3.1% of the national production, respectively (44, 76). Leprosis reports are recent in both states and there is increasing concern because the vector's population density is high in the region (73) and sweet orange 'Pera,' highly susceptible, represents up to 70% of the citrus cultivated in the area (77). Together, Bahia and Sergipe represent 95% of the northeastern citrus production (77) and leprosis has already caused significant damage, mainly in Bahia, where the government encouraged eradication of infected trees in new areas and chemical control of the disease for several years after the first symptoms were observed in the state, in 1999 (88). Citrus leprosis was reported for the first time in Bahia, in the municipalities of Itapicuru and Rio Real on the north coast of the State that produces more than 50% of the citrus in Bahia (76). The disease is not present in the Recôncavo Sul region, which, with the northern coast, represents more than 80% of the citrus production of the state (76).

The citriculture of Sergipe is geographically close to the major producing municipalities of Bahia. Even though the growers and technicians of Sergipe Agricultural Bureau made a considerable effort to eliminate the disease foci in neighbor municipalities to avoid leprosis in the state, the disease was reported by Boari *et al* (9). The symptoms of leprosis observed in this region, like those in Rio Real (BA), are quite different from those found in other regions of the country, exhibiting larger

green ringspots (9, Figure 1). However, a molecular diagnostic tool used for the detection of CiLV-C in samples from different regions of Brazil and abroad (34, 58) detected the virus in samples with atypical symptoms as well, proving that they are caused by the same pathogen (9).

To date there are no formal reports of leprosis in other states of the Brazilian northeast; however, a survey is necessary to confirm that they are leprosis-free regions. With the citrus industry advancing to new areas, it is possible that the disease distribution will increase once the vector is found countrywide.



FIG. 4 – Brazilian macro-regions. **North:** AC. Acre, AM. Amazonas, AP. Amapá, PA. Pará, RO. Rondônia, RR. Roraima, TO. Tocantins; **Northeast:** AL. Alagoas, BA. Bahia, CE. Ceará, MA. Maranhão, PB. Paraíba, PE. Pernambuco, PI. Piauí, RN. Rio Grande do Norte, SE. Sergipe, **Midwest:** DF. Distrito Federal, GO. Goiás, MS. Mato Grosso do Sul, MT. Mato Grosso, **Southeast:** ES. Espírito Santo, RJ. Rio de Janeiro, SP. São Paulo, **South:** PR. Paraná, RS. Rio Grande do Sul, SC. Santa Catarina. In gray, Brazilian states with reports of citrus leprosis. The disease is also present in the State of Roraima (RR), but there is no formal report on that occurrence.

Leprosis worldwide distribution

In 1999, leprosis was reported in Venezuela (78), and by 2000 it had reached Panama and Costa Rica in Central America (1, 26). It is currently reported in several South and Central American countries, and Mexico in North America (4, 80). Recent formal reports of leprosis occurrence were based in characteristic symptoms, TEM analyses and, in some instances, the RT-PCR method developed by Locali *et al.* (58). The disease is now also confirmed in Guatemala (61), Bolivia (37), Colombia (55) and Honduras (83). Additionally, according to OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), which includes Mexico, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica and Panama, in 2003, typical symptoms of citrus leprosis were found in every Central American's country, except for Belize (70) (Figure 5). Recent surveys in Belizean citrus orchards supported the leprosis-free status of the country (Stephen Williams, Citrus Research & Educational Institute of the Belize Citrus Growers Association, *personal communication*).

The recent northward spread of the disease within the Americas is a fact, but there are several questions regarding how this is occurring. Leprosis virus is found localized only in the conspicuous lesions; hence, contrary to other citrus viruses and viroids that infect their hosts systemically, transmission by infected budwood is very unlikely. Experimental transmission of CiLV by budwood is possible but difficult to achieve (14, 52, 93). It is possible that plants infected by the virus or carrying viruliferous mites were taken to new citrus growing areas. It should be noted that total production and consumption of citrus has increased significantly since the 1980s, with oranges, which are highly susceptible to leprosis, accounting for more than half of global citrus production in 2004 (91). Additionally, the mite has the capability of dispersion by itself and also by the wind; hence, viruliferous mites may have arrived in new areas and were responsible for the introduction of the disease.

The most likely hypothesis, though, is that the disease has occurred unnoticed in some of these areas for long periods of time. The symptoms of leprosis are typical, but sometimes it takes years for the growers to actually observe them or acknowledge the problem in their orchard. In São Paulo State, Brazil, when the inoculum is present in an area and acaricides are not applied, the disease typically spreads through the orchard and reaches levels causing perceptible yield damage in two to three years. This is because disease incidence and severity progress rates are not as high as those for other citrus diseases; however, because leprosis is a polyetic disease, the amount of infected tissue, as well as initial inoculum, increase yearly (24).

Information obtained from growers support this idea. In Guatemala, growers mentioned that they saw symptoms of leprosis in their orchards years before the identification of the causal agent. In some cases, the symptoms were confused with those caused by psorosis, particularly when branches were affected. In other cases, the growers simply did not know what caused the symptoms, but, since they were not widespread within the orchards, producers were not concerned about them. Only after buildup of inoculum and greater incidence and severity of the disease in the field, the growers sought help. This scenario may have contributed to the perception that the disease remained limited to an area for years and suddenly spread to new areas.

The official report about citrus leprosis from OIRSA brings interesting details about the geographic localization of disease foci in the member countries and mentions that the incidence of leprosis is especially severe in Guatemala, where the disease seems to have occurred since 1995 despite its recent report (74). This information is corroborated by Palmieri *et al.* (74), who reported that leprosis is in every citrus producing area of Guatemala. In this country the disease is forcing growers to replace sweet orange groves with other citrus species that show some tolerance or resistance (70). Also according to OIRSA (70), El Salvador also showed severe and apparently old leprosis foci, with original inoculum probably introduced from Guatemala.

The recent establishment of citrus leprosis in Central America represents a potential threat to citriculture in North America, the second most important citrus producer in the world, and to other citrus producing countries. It could be said that there is an imminent threat of the reintroduction of the disease in the USA (18) and in Caribbean islands in few years. Also, due to disease dissemination in new American countries, its importance has increased significantly in the latest years, such that it is now included in the quarantine list of important pests in Europe (28). In Colombia, even after preventive measures were adopted, virus presence was confirmed in a few years (55). In this country, citrus leprosis occurs only in the Llanos Orientales region (Departments of Meta and Casanare). For that reason, CORPOICA (Corporación *Colombiana* de Investigación Agropecuaria) is distributing information about leprosis and trying to avoid its dissemination to leprosis-free regions. However, researchers from ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) have recently found leprosis in Ibagué, Department of Tolima, showing that the disease has reached the mountains (Díaz, Castañeda and Freitas-Astúa, *unpublished data*).

Many countries or regions tried to eradicate citrus leprosis after its first report, but frequently they began too late, simply because when the symptoms are identified, the disease has already spread in the region for some time due to its slow dissemination rate. A classic example of success in disease eradication is the USA. The first country to describe citrus leprosis, it currently has *Brevipalpus* spp. but is free of the disease. Leprosis was eradicated from the country probably due to a combination of application of sulfur acaricides and unfavorable climatic conditions such as frosts that, together, were able to eliminate the viruliferous mites and the inoculum from infected trees at least 30 or 40 years ago (19). Additionally, it is possible that the virus present in Florida was the CiLV-N. This hypothesis was raised based on the symptoms reported, on the facts that CiLV-N tends to be found in cooler regions and is less efficiently transmitted by *Brevipalpus* spp. If this hypothesis is true, the relatively low fitness of the virus could have contributed to the success of leprosis eradication in the USA.



FIG. 5 – American countries with reports of citrus leprosis.

Recent efforts to eradicate leprosis were made in Costa Rica and Mexico. In 2000, the disease was identified in Costa Rica, near the Panama border – a region of forests and with little or no tradition in citrus cultivation. The few symptomatic plants were eliminated and the country was considered free of the disease (Lisela Moreira, Universidad de Costa Rica, *personal communication*). However, with the identification of leprosis in Nicaragua (27, 40), on the northern border of Costa Rica, the disease is threatening Costa Rica again, and this time near the citrus producing area of the country. In Mexico, soon after the leprosis outbreak in Chiapas in 2005 (87), an emergency program for its eradication was established. In 2006, the “Norma Oficial de Emergencia” (NOM-EM-046-FITO-2006) was published, in which an Emergency Official Standard was created with the objective of confining, eradicating, and preventing leprosis dissemination in Chiapas State (85). Even with the

efforts to contain the disease, it was recently observed in 2007 in the State of Tabasco (89). Although it is still restricted to the south of Mexico, there was an apparent advance of the disease. In other countries, as Guatemala and Colombia, where leprosis identification was done when the disease was already spread in several orchards, the producers are living with the disease (55, 70).

Final considerations

Citrus is grown in 22 of 27 Brazilian states, but about 99% of the sweet oranges produced originate from nine states: São Paulo, Bahia, Sergipe, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás, and Rio de Janeiro, situated in the Southeast, Northeast, South and Midwest regions (44). In all of them citrus leprosis is present, though it assumes greater economic importance in Sao Paulo State, which is responsible for more than 80% of Brazilian sweet orange production.

In almost all of the American countries where leprosis was reported in the beginning of the 20th century, the disease is still present, but its importance had been restricted to Brazil, especially Sao Paulo State, during most of those years. However, after the recent reports in new areas, the relevance of the disease and the losses it causes have significantly increased. Old reports of the disease in other continents are likely misinterpretation of symptoms, and need further confirmation.

Although leprosis is a disease known for more than one century, its current importance is undeniable. For years, researchers addressed mainly aspects related to the vector biology and control and, in few instances, studies on responses of some citrus species and varieties to the virus. While the results were important and informative to the citrus growers, they dealt with only part of the problem. In recent years, research has been focused on the pathosystem. Examples include the epidemiological studies conducted by Bassanezi and Laranjeira (3) and Czermaniski *et al.* (24), and studies on the inheritance of the resistance against the virus (5), developing a quick and efficient diagnosis method (5), the possibility of tracking viruliferous mites in the field (66), the CiLV-C genome (59, 75), the

identification of differentially expressed genes in symptomatic plants (30), the presence and the role played by the endosymbionts in the vector (38, 67, 94), and the investigation of virus-vector interactions (64, 79). These studies have already brought new insights about this complex pathosystem, contributing to a more efficient management of the disease, benefiting growers and the final consumer of our daily orange juice.

Acknowledgments

The authors thank those who provided information on leprosis and/or the citrus industry in their regions: Angel Monter Villegas (Colégio de Pós-Grado, Texococo, México), Décio Joaquim (Grupo de Consultores - GTACC, São Paulo), Gerd Muller (Instituto Agronômico de Campinas), Hécio Costa (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural-Incaper, Espírito Santo), João Meneguci, Embrapa Transferência de Tecnologia, Goiás), José Dagoberto de Negri (Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, São Paulo), Leonardo Góes Silva (Incra, BA), Lisela Morera (Universidad de Costa Rica, Costa Rica), Luís Antônio Chiaradia (Epagri/Cepaf, Santa Catarina), Márcio Sandrini (Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural, AGRAER, Mato Grosso), Osvino Leonardo Koller (Epagri, Santa Catarina), Sérgio Alves de Carvalho (Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, São Paulo), Stephen Williams (CREI/CGA, Belize), and Zuleide Hissano Tazima (Iapar, Paraná).

Literature cited

1. Araya Gonzáles, J. (2000). Informe sobre la prospección de la “leprosis de los cítricos” en la zona fronteriza sur (Costa Rica – Panamá). Panama. Ministério de Agricultura y Ganadería. p.5.
2. Bassanezi, R. B. (2001). Aspectos da leprose dos citros. *Fitopatol. Bras.*, 26:246-247.

3. Bassanezi, R. B., and Laranjeira, F. F. (2007). Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. *Plant Pathol.*, 56:97-106.
4. Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., and Machado, M. A. (2006). The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathol.*, 32:211-220.
5. Bastianel, M., Oliveira, A. C., Cristofani, M., Guerreiro Filho, O., Freitas-Astúa, J., Rodrigues, V., Astua-Monge, G., and Machado, M. A. (2006). Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. *Phytopathology*, 96:1092-1096.
6. Bitancourt, A. A. (1934). Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. *Arquivos do Instituto Biológico*, 5:185-196.
7. Bitancourt, A. A. (1940). A leprose dos citros. *O Biológico*, 6:39-45.
8. Bitancourt, A. A. 1955. Estudos sobre a leprose dos citros. *Arquivos do Instituto Biológico*, 22:161-231.
9. Boari, A. J., Mendonça, M. C., Freitas-Astúa, J., Gonçalves, L. O., and Silva-Mann, R. 2007. Ocorrência da leprose dos citros no Estado de Sergipe. *Fitopatol. Bras.*, 32:207-207.
10. Boari, A. J., Penner, G., Filgueiras, S. B. Q., Freitas-Astúa, J., and Kitajima, E. W. (2007). Confirmação da presença da leprose dos citros tipo citoplasmática no Estado do Pará. *Fitopatol. Bras.*, 32:207-207.
11. Bobot, T. E., Oliveira, E. F., Chilson, E. F., and Oliveira, P. Y. (2006). Ácaros Eriophyoidea em pomares de laranja (*Citrus sinensis*) no município de Manaus (AM). I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa, 202-202.
12. Bobot, T. E., Oliveira, E. F., Chilson, E. F., and Oliveira, P. Y. (2006). Espécies de ácaros tenuipalpidae em pomares de laranja (*Citrus sinensis*) no município de Manaus (AM). I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa, 213-213.

13. Chagas, C. M., Colariccio, A. and Harakava, R. (2006). Novos registros da leprose tipo nuclear (CiLV-N): Andradas (MG) e São Roque (SP). *Fitopatol. Bras.*, 3:139-139.
14. Chagas, C. M., and Rossetti, V. V. (1984). Transmission of leprosis by grafting. In: Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA (Eds.) Proc. The 9th Conf. International Organization of Citrus Virologists. Riverside, USA. IOC.V. pp. 215-217.
15. Chagas, C. M., Rossetti, V. V., and Chiavegato, L. G. (1984). Effectiveness of the different life cycle stages of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes in leprosis transmission. In: Garnsey, S. M., Timmer, L. W., and Dodds, J. A. (Eds.) Proc. The 9th Conf. International Organization of Citrus Virologists. Riverside, USA. IOC.V. pp. 211-214.
16. Chiaradia, L. A., Milanez, J. M., and Souza, L. C. (2000). Caracterização, danos e alternativas para o controle do ácaro-da-leprose dos citros. **Agropecu. Catarin.**, 13:15-19.
17. Chiaradia, L. A., and Souza, L. C. (2001). Flutuação populacional do ácaro-da-leprose *Brevipalpus phoenicis* em pomares de citros do Oeste catarinense. **Pesqui. Agropecu. Gaucha**, 7:201-209.
18. Childers, C. C., and Derrick, K. S. (2003). *Brevipalpus* mites as vectors of unassigned rhabdoviruses in various crops. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:1-3.
19. Childers, C. C., Rodrigues, J. C. V., Derrick, K. S., Achor, D. S., French, J. V., Welbourn, W. C., Ochoa, R., and Kitajima, E. W. (2003). Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:181-202.
20. Childers, C. C., Rodrigues, J. C. V., Kitajima, E. W., Derrick, K. S., Rivera, C., and Welbourn, W. C. (2001). A control strategy for breaking the virus-vector cycle of *Brevipalpus* spp. and the Rhabdovirus disease, citrus leprosis. *Manejo Integr. Plagas (Costa Rica)*, 60: 76-79.
21. Choudhari, K. G., and Mali, V. R. (1978). Leprosis disease and its role in citrus dieback. *Sci. Cult.*, 44:166-167.

22. Colariccio, A., Lovisolo, O., Chagas, C. M., Galetti, S. R., Rossetti, V. V., and Kitajima, E. W. (1995). Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. *Fitopatol. Bras.*, 20:208-213.
23. Cunha Junior, J. O., Pozzer, L., and Brioso, P. S. T. (2007). Variabilidade biológica de isolados do Citrus leprosis virus (CiLV) oriundos de cultivares de laranjeira. *Summa Phytopathol.*, 33:294-296.
24. Czermainski, A. B. C., Bassanezi, R. B., Laranjeira, F. F., and Amorim, L. (2007). Dinâmica temporal da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* e da leprose dos citros sob condições naturais de epidemia. *Fitopatol. Bras.*, 32:295-303.
25. Domingues, A. D., and Rodrigues, J. C. V. (1999). Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). *Laranja*, 20:35-50.
26. Dominguez, F. S., Bernal, A., Childers, C. C., and Kitajima, E. W. (2001). First report of citrus leprosis on Panama. *Plant Dis.*, 85:228-228.
27. El Nuevo Diáριο. (2006). Managua, Nicaragua - Miércoles 24 de Mayo de 2006 - Edición 9257.
28. Eppo, (2007). www.eppo.org/quarantine/virus/Citrus_leprosis_virus/CILV00_ds, accessed in December 05, 2007.
29. Fawcett, H. S. (1936). *Citrus diseases and their control*. 2nd Ed. New York. McGraw-Hill.
30. Freitas-Astúa, J.; Bastianel, M.; Locali-Fabris, E. C.; Novelli, V. M.; Silva-Pinhati, A. C.; Basílio-Palmieri, A. C.; Targon, M. L. N. P. and Machado, M. A. (2007). Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. *Genet. Mol. Biol.*, 30: 980-990.
31. Freitas-Astúa, J., Cavalcante, M. J. B., Locali, E. C., Antonioli, R., Laranjeira, F. F., Domingues, A. D., and Machado, M. A. (2004). RT-PCR detection of Citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. *Virus Rev. Res.*, 9:246-247.

32. Freitas-Astúa, J.; Fadel, A. L.; Bastianel, M.; Novelli, V. M.; Antonioli-Luizon, R., and Machado, M. A. (2008). Resposta diferencial de espécies e de híbridos de citros à leprose. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 43: 809-814.
33. Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Bastianel, M., Locali, E. C., Antonioli, R., and Machado, M. A. (2004). Identification of citrus leprosis virus-nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the state of Rio Grande do Sul. *Virus Rev. Res.*, 9:247-247.
34. Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Locali, E. C., Antonioli-Luizon, R., Bastianel, M., and Machado, M. A. (2005). Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. In: Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Caribbean Division, XLV., 2005, Annals. San Jose: APS. pp. 93.
35. Freitas-Astúa, J., Novelli, V. M., Rodrigues, V., Caetano, A. A., Antonio-Luizon, R., Locali-Fabris, E. C., Bastianel, M., Kitajima, E. W., Lopes, S. A., and Machado, M. A. (2006). Ocorrência da leprose dos citros no estado do Amazonas. *Fitopatol. Bras.*, 39:574-574.
36. Frezzi, M. J. (1940). La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bela Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas. Buenos Aires. Min. Agr. de la Nación.* n.5, 16p.
37. Gómez, E. C., Vargas, M. R., Rivadameira, C., Freitas-Astúa, J., Astúa-Monge, G., Locali, E. C., Rodrigues, J. C. V., Cobo, N. C. M., and Kitajima, E. W. (2005). First report of the leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C) in Santa Cruz, Bolívia. *Plant Dis.*, 89:686-686.
38. Groot, T. V. M., and Breeuwer, J. A. J. 2006. *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Exp. Appl. Acarol.*, 39: 257-271.
39. Groot, T. V. M., Freitas-Astúa, J., and Kitajima, E. W. (2006). *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. *Virus Rev. Res.*, 11: 67-68.

40. Guerra-Moreno, A. S. (2004). Partial molecular characterization and development of a rapid diagnostic method for Citrus leprosis virus (CiLV) from Panama. Master Thesis, University of Florida, EUA. 80p.
41. Horn, T. B., Silva, J. F., Fava, J., Diehl, M., Marchetti, M. M., and Ferla, N. J. (2006). Acarofauna (Acari) em citros da variedade Valência (*Citrus sinensis*) (L.) Osbeck, no Vale do Taquari, RS. In: Anais do I Simpósio Brasileiro de Acarologia, 2006, Viçosa p.197.
42. IAPAR. (1992). A citricultura no Paraná. Circular técnica, IAPAR, Paraná.
43. ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). 2008. <http://talk.ictvonline.org/files/folders/plant02/default.aspx> (accessed in August 18, 2008).
44. iFNP. (2007). Agriannual 2007: Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. FNP Consultoria & Agroinformativo.
45. Kitajima, E. W., Calegario, R. F., Locali-Fabris, E. C, Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., and Francischini, F. (2008). *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and a model for the virus circulation in the mite. *Trop. Plant Pathol.*, 33:289-289.
46. Kitajima, E. W., Chagas, C. M., and Rodrigues, J. C. V. (2003). *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Exp. Appl. Acarol.*, 30:135-160.
47. Kitajima, E. W., Ferreira, P. T. O., Freitas-Astúa, J., and Machado, M. A. (2004). Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. *Summa Phytopathol.*, 30:68- 68.
48. Kitajima, E. W., Moraes, G. J., Calegario, R. F., and Salarolli, R. B. (2006). Visualização dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) nos tecidos do ácaro vetor. *Fitopatol. Bras.*, 31:214-215.

49. Kitajima, E. W., Müller, G. W., Costa, A. S., and Yuki, W. (1972). Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology*, 50:254-258.
50. Kitajima, E. W., Rosillo, M. A., Portillo, M. M., Müller, G. W., and Costa, A. S. (1974). Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. *Fitopatologia* 9:55-56.
51. Knorr, L. C. (1950). Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus. *Phytopathology*, 40:15-15.
52. Knorr, L. C. (1968). Studies on the etiology of leprosis in citrus. In: Childs, J. F. L. (Ed.) Proc. The 4th Conf. International Organization of Citrus Virologists. Gainesville, USA. IOCV. pp. 332-340.
53. Kondo, H., Takanori, M., Shirako, Y., and Tamada, T. (2006). Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J. Gen. Virol.*, 87:2413-2421.
54. León, M. G., Becerra, C. H., Freitas-Astúa, J., Salaroli, R. B., and Kitajima, E. W. (2008). Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. *Plant Dis.*, 92: 1364.
55. Leon, G. A., Realpe, C. E., Garzon, P. A., Rodriguez, J. A., Moreno, M. G., Childers, C. C., Achor, D., Freitas-Astúa, J., Antonioli-Luizon, R., Salaroli, S. B., Cobo, N. C. M., and Kitajima, E. W. (2006). Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. *Plant Dis.*, 90:682.
56. Liberato, J. R., Costa, H., and Ventura, J. A. (1996). Índice de doenças de plantas do Estado do Espírito Santo. Vitória. EMCAPA.
57. Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., Müller, G. W., Nunes, W. M. C., Nunes, M. J. C., Theodoro, G. F., Antonioli, R., Souza, A. A., Bastianel, M., and Machado, M. A. (2004). Haplótipos do vírus da

- leprose dos citros identificados nos estados do sul do Brasil através de SSCP do gene da proteína de movimento e replicase. *Fitopatol. Bras.*, 29:98-99.
58. Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., Souza, A. A., Takita, M. A., Astúa-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E. W., and Machado, M. A. (2003). Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas. *Plant Dis.*, 87:1317-1321.
59. Locali-Fabris, E. C., Freitas-Astúa, J., Souza, A. A., Takita, M. A., Astúa-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon, M. L. P. N., and Machado, M. A. (2006). Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C). *J. Gen. Virol.*, 87:2721-2729.
60. Locali-Fabris, E. C., Stach-Machado, D. R., Caserta, R., Freitas-Astúa, J., Calegario, R. F., Salaroli, R. B., Kitajima, E. W., and Machado, M. A. (2008). *In vitro* expression and production of antiserum to the capsid protein (P29) of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). *Tropical Plant Pathology* 33, CD-Room, VIR-065.
61. Mejia, L., Paniagua, A., Cruz, N., Porras, M., and Palmieri, M. (2002). Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. *Proc. 42nd Ann. Mtg. Amer. Phytopathol. Soc., Caribbean Div., Antigua, Guatemala*, p.17-19.
62. Murayama, D., Agrawal, H. O., Inoue, T., Kimura, I., Shikata, E., Tomaru, K., and Tsuchizaki, T. (1998). *Plant viruses in Asia*. Yogyakarta. Gadjah Mada Univ. Press.
63. Mussumeci, M. R., and Rossetti, V. V. (1963). Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Cienc. e Cult.*, 15:228-228.
64. Nicolini, F., Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., Kubo, K., Antonioli-Luizon, R., Schons, J., and Machado, M. A. (2007). Evidence suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of the circulative propagative type. In: XII Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 2007. Adana, Turkey: IOCV, 156

65. Nicolini, F., Bastianel, M., Schons, J., Kitajima, E. W., Locali-Fabris, E. C., Pereira, J. A., Kubo, K. S., Novelli, V. M., Machado, M. A., and Freitas-Astúa, J. (2008). Comparação entre os títulos de vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* por RT-qPCR. *Trop. Plant Pathol.*, 33, Supl. p. S287.
66. Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Antonioli-Luizon, R., Locali, E. C., Arrivabem, F., Hilf, M. E., Gottwald, T. R., and Machado, M. A. (2005). Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). *Fitopatol. Bras.*, 30:183-183.
67. Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Arrivabem, F., Locali-Fabris, E. C., Hilf, M. E., Gottwald, T. R., and Machado, M. A. (2007). Effects of temperature, storage period and the number of individuals on the detection of the false spider mite *Cardinium* endosymbiont. *Exp. Appl. Acarol.*, 42:17-21.
68. Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Locali, E. C., Bastianel, M., Cazon, R. C., Carvalho, S. A., Meneguci, J., Sandrini, M., Morias, J. B., and Machado, M. A. (2006). Ocorrência de leprose dos citros em pomares de Mato Grosso do Sul e Goiás. *Summa Phytopathol.*, 32:36-36.
69. Nunes, A. (2007). Transmissão do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) para plantas próximas de pomares cítricos. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
70. OIRSA. (2003). Resultados del mustreo regional de leprosis de los cítricos – Informe. Junio 2003.
71. Oliveira, B. M., Silva, S. C. S., Oliveira, P. Y., Bobot, T. E., and Franklin, E. (2006). Ácaros (Acari: Oribatida) em pomares de laranja (*Citrus sinensis*) na região de Manaus (AM). I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa, pp. 231.
72. Oliveira, C. A. L. (1986). Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. *Laranja.*, 7:1-31.

73. Oliveira, V. S., Noronha, A. C. S., Argolo, O. S., and Carvalho, J. E. B. (2006). Acarofauna em pomares cítricos do Estado da Bahia. In: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, Londrina Paraná. pp.14.
74. Palmieri, M., Donis, I., Salazar, A. L., Blanco, S., Porres, M., Brlansky, R. H., Guerra-Moreno, A. S., Manjunath, K. L., and Lee, R. F. (2005). Leprosis in Guatemala. In: Hilf, M. E., Duran-Vila, N., and Rocha-Peña, M. A. (Eds.) Proc. The 16th Conf. International Organization of Citrus Virologists. Riverside, USA. IOCV. pp. 510.
75. Pascon, R. C., Kitajima, J. P., Breton, M. C., Assumpção, L., Greggio, C., Zanca, A., Okura, V. K., Alegria, M. C., Camargo, M. E., Silva, G. G. C., Cardozo, J. C., Vallim, M. A., Franco, S. F., Silva, V. H., Jordão, Júnior H., Oliveira, F., Giachetto, P. F., Ferrari, F., Aguillar-Vildoso, C. I., Francischini, F. J. B., Silva, J. M. F., Arruda, P., Ferro, J. A., Reinach, F., and Silva, A. C. R. (2006). The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLV-C). *Virus Genes*, 32: 289-298.
76. Passos, O. S., and Santana, M. A. 2004. Citricultura no estado da Bahia. *Toda Fruta*, Edição 13 de abril de 2004, www.todafruta.com.br.
77. Passos, O. S., Santos Filho, H. P., Cunha Sobrinho, A. P., Coelho, Y. S., Soares Filho, W. S., Nascimento, A. S., Magalhães, A. F. J., Souza, L. D., and Ritzinger, C. H. S. P. (2005). Certificação e diversidade da citricultura no nordeste brasileiro. *Toda Fruta*, edição 13 de junho de 2005, www.todafruta.com.br.
78. Rangel, E., Kitajima, E. W., Cermelli, M., and Centeno, F. (2000). Recentes avances em el estudio de la leprosis de los cítricos em Venezuela. In: Del Valle *et al.* (Eds.) *Memorias VII Congreso Nacional de Frutales*. San Cristóbal. Universidad Nacional Experimental Tachira pp. 154.

79. Rodrigues, J. C. V. (2000). Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura -Universidade de São Paulo, Piracicaba.
80. Rodrigues, J. C. V., Kitajima, E. W., Childers, C. C., and Chagas, C. M. (2003). Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.*,30:161-179.
81. Rodrigues, J. C. V., Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., and Kitajima, E. W. (2005). Transmissibility of Citrus leprosis virus by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaeifolium*. *Plant Dis.*, 89:911-911.
82. Rodrigues, J. C. V., Nogueira, N. L., Freitas, D. S., and Prates, H. (1997). Virus- like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil*, 26:391-395.
83. Rodrigues, J. C. V., Zuniga Reyes, J. A., Achor, D. S., Childers, C. C., and Kitajima, E. W. (2007). Occurrence and distribution of Citrus leprosis virus in Honduras. *Plant Pathol.*, 56(2):344-344.
84. Rossetti, V. (1995). A leprose dos citros no Brasil. In: *Leprose dos Citros*. (Eds. Oliveira, C. A. L. & Donadio, L. C), Jaboticabal: FUNEP, p. 1-12.
85. Sagarpa. (2006). Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-046-FITO-2006, Por la que se instrumenta el Dispositivo Nacional de Emergencia, con el objeto de confinar, erradicar y prevenir la dispersión de la leprosis de los cítricos en el estado de Chiapas. *Diario Oficial del 18 de Abril de 2006*: 45-48.
86. Salva, R. A., and Massari, C. A. (1995). Situação do ácaro da leprose no estado de São Paulo, levantamento – Fundecitrus, agosto 1995. In: Oliveira C. A. L., Donadio L. C. (Eds.) *Leprose dos citros*. Jaboticabal. Funep, pp.13-18.
87. Sánchez Anguiano, H. (2005). Detection of citrus leprosis in the state of Chiapas, Mexico. *North*

- American Plant Protection Organization, Phytosanitary Alert. 9/7/2005.
88. Seagri. (2005). <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=12759> (accessed in August 19, 2008).
89. Senasica, (2008). <http://mail2.senasica.gob.mx/default.asp?id=1011> (accessed in January 05,2008).
90. Spegazzini, C. (1920). Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. *Ann Soc. Cient.* 90:155-188.
91. UNCTAD (United Nations Conference on Trade and Development), (2009). <http://www.unctad.org/infocomm/anglais/orange/market.htm> (accessed in July 20, 2009).
92. Veloso, V. R. S., Silva, A. L., Sanchez, S. M. E., and Rocha, M. R. (1988). Controle químico do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae), transmissor da leprose em citros. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinaria* 18:141-149.
93. Vergani, A. R. (1945). Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo. Ministerio de Agricultura de la Nación. Buenos Aires. Instituto Sanidad Vegetal. Serie A.5, p.1-11.
94. Weeks, A. R.; Marec, F., and Breeuwer, J. A. J. (2001). A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, 292: 2479-2482.