



ESTABILIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO COMPLEXO DO *CITRUS TRISTEZA VÍRUS* EM PLANTAS DE LARANJA ‘PÊRA’, AVALIADO PELA ANÁLISE SSCP.

*Larissa Siqueira Soares*¹; *Inaiara de Souza*¹; *Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zulian*²;
*Paula Thais Requena Nocchi*¹; *Carlos Alexandre Zanutto*³;
*William Mário de Carvalho Nunes*⁴

RESUMO: O *Citrus tristeza virus* (CTV), agente causal da tristeza dos citros, é um Closterovirus que existe como um complexo de isolados que diferem nas suas propriedades biológicas e imunológicas e induzem variados sintomas. Múltiplas inoculações do vírus pelo afídeo vetor e a movimentação de material infectado com isolados severos entre as regiões citrícolas, favorecem a disseminação da virose e promovem ocorrência de mutações e recombinações gênicas. Essas modificações podem afetar a estabilidade e a variabilidade genética do complexo viral dentro do hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo investigar a estabilidade por padrão de bandas geradas por SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), do gene da proteína do capsídeo do CTV, nos diferentes quadrantes de plantas selecionadas, ao longo do tempo. Os resultados obtidos apontaram uma manutenção dos perfis eletroforéticos dos padrões SSCP das amostras obtidas nos quadrantes e no topo de cada uma das plantas analisadas ao longo do tempo indicando estabilidade do complexo viral dentro da planta. Entretanto diferenças nos padrões SSCP foram encontradas ao comparar os padrões obtidos entre as plantas analisadas, fato provavelmente resultante da transmissão de diversos haplótipos de CTV por afídeos ocasionando variações nas populações de RNA do CTV.

PALAVRAS-CHAVE: *Citrus sinensis*; haplótipos; vírus; Tristeza dos citros.

1. INTRODUÇÃO

O *Citrus tristeza vírus* (CTV) destaca-se por seu caráter endêmico e seus efeitos destrutivos (Moreno et al., 2008). Membro dos Closterovirus, o CTV ocorre no floema das plantas cítricas como um complexo de haplótipos relacionados imunologicamente, mas geneticamente diferentes e encapsulados em uma capa de duas subunidades protéicas (Zhou et al., 2007). A disseminação do CTV para novas áreas ocorre por meio da movimentação de materiais propagativos infectados. À medida que a propagação a longa distância ocorre, a presença de afídeos vetores nos pomares contribuem para a disseminação secundária do vírus dentro de uma região (Herron et al., 2003).

¹ Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. paizinhos_larissa@hotmail.com

² Doutoranda do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. alineorb@hotmail.com

³ Eng. Agrônomo, Dr. da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. cazanutto@uem.br.

⁴ Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. william.nunes@pq.cnpq.br

A introdução de novos genótipos do vírus na planta hospedeira por meio de múltiplas inoculações pelo afídeo vetor (*Toxoptera citricida* Kirk.) estimula o aparecimento de recombinações e mutações promovendo o aumento de variantes genéticas que podem evoluir para novas emergentes do vírus (Bordignon et al., 2003). Entre as técnicas moleculares existentes, o SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) permite a identificação de mutações e polimorfismos entre os complexos virais de plantas infectadas e, ao longo do tempo (Sambade et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi analisar e comparar a estabilidade dos padrões SSCP do *Citrus tristeza vírus* (CTV) de três plantas de laranja da variedade 'Pêra' ao longo do tempo e analisar a estabilidade dos padrões SSCP do CTV nos quadrantes de cada uma das três plantas individualmente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização das análises laboratoriais foram coletados ramos jovens e folhas, em duas etapas com intervalo de um ano entre elas. Foram coletados nos quadrantes e no topo de três plantas de laranja 'Pêra', situadas em um pomar comercial do município de Nova Esperança, PR. Esse material foi lavado e dele extraído a nervura central das folhas e as cascas dos ramos, em seguida foram identificados e armazenados a -20°C.

Utilizou-se para a extração do RNA total o reagente Trizol®, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen). A síntese do cDNA foi conduzida de acordo com o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989). O gene da capa protéica do vírus (GCP) foi isolado e amplificado por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR) com o uso de dois primers específicos: CN119 (5'AGA TCT ACC ATG GAC GAC GAA ACA AAG 3') e CN120 (5'GAA TTC GCG GCT CAA CGT GTG TTA AAT TTC C 3') derivados do haplótipo T36 da Flórida. A amplificação foi realizada em aparelho termociclador programado para 35 ciclos, ocorrendo desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 55°C e síntese de DNA por 2 minutos a 72°C, seguido por um período de extensão de 5 minutos a 72°C.

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 0,8% e fotografado sob luz ultra-violeta (UV). A análise SSCP será realizada de acordo com a metodologia usada por Corazza-Nunes et al. (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos perfis eletroforéticos de SSCP do GCP apontou um padrão complexo de bandas em cada perfil, revelando a ocorrência de duas a seis bandas, sugerindo a presença de um a três haplótipos nos isolados de CTV. Nos dois períodos analisados, os padrões de bandas encontradas nas amostras de cada planta estudada foram bastante semelhantes apontando uma distribuição homogênea do CTV por toda a planta individualmente (figura 1).

Por outro lado, os perfis eletroforéticos observados entre as plantas analisadas mostraram-se diferentes, fato provavelmente devido a sucessivas inoculações, possivelmente com diferentes haplótipos virais, pelos afídeos vetores. Múltiplas inoculações por afídeos podem favorecer variações nas populações de RNA genômico de CTV, como já descrito por Albiach-Martí et al. (2000) (Figura 1).

Os isolados dos quadrantes e topo das três plantas analisadas apresentaram perfis eletroforéticos idênticos nos dois períodos estudados, presumindo que não houve modificação nos haplótipos de CTV, componentes do complexo viral nas plantas, mostrando alta estabilidade genética do CTV em uma mesma planta (figuras 1 e 2).

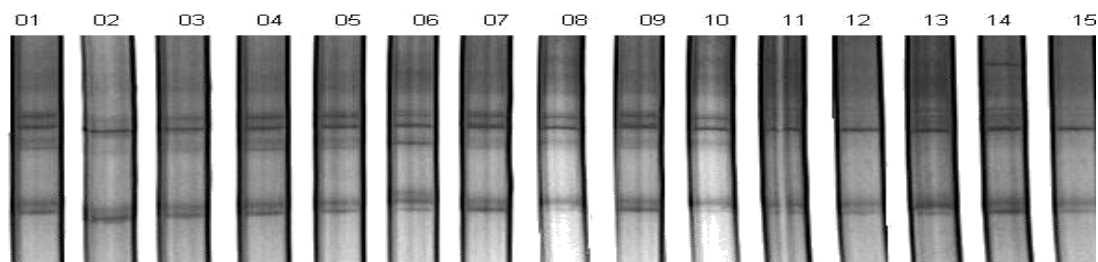


Figura 1. Padrões SSCP dos isolados de CTV, em gel de poliacrilamida a 8%. Isolados oriundos da primeira coleta. Amostras de 01 a 05 correspondem aos quadrantes da planta 1. Amostras de 06 a 10 correspondem aos quadrantes da planta 2 e amostras de 11 a 15 correspondem aos quadrantes da planta 3.

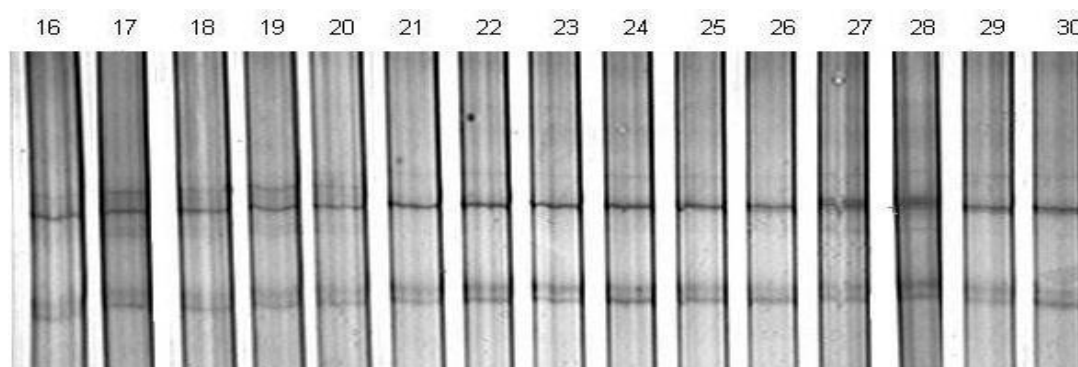


Figura 2. Padrões SSCP dos isolados de CTV em gel de poliacrilamida a 8%. Isolados oriundos da segunda coleta. Amostras de 16 a 20 correspondem aos quadrantes da planta 1. As amostras de 21 a 25 correspondem aos quadrantes da planta 2 e as amostras de 26 a 30 correspondem aos quadrantes da planta 3.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, em relação às análises dos padrões SSCP, indicaram que os isolados contidos nas plantas apresentaram-se estáveis e bem distribuídos por todos os quadrantes das plantas analisadas. Inoculações sucessivas de diferentes haplótipos de CTV entre as plantas que compõem um pomar cítrico por afídeos virulíferos podem ocasionar diferenças entre os padrões eletroforéticos de SSCP encontrados entre as plantas.

5. REFERÊNCIAS

ALBIACH-MARTÍ, M.R; GUERRI, J.; HERMOSO DE MENDOZA, A.; LAIGRET, F.; BALLESTER-OLMOS, J. F.; MORENO, P. Aphid Transmission Alters the Genomic and Defective RNA Populations of *Citrus tristeza virus* Isolates. **Phytopathology**, 90, 134–138, 2000.

BORDIGNON, R.; FILHO, H.P.M.; MULLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia** v.62, n.3, p. 345-365, 2003.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of *Citrus tristeza virus* (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 11-16, 2001.

HERRON, C. M. *Citrus tristeza virus*: characterization of texas Isolates, studies on aphid transmission and pathogen-derived control strategies. 2003.

MORENO, P.; AMABRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GUERRI, J.; PENÃ, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the Citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p. 251-268, 2008.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, v.51, p.257-265, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, cold spring harbor laboratory. **Cold spring harbor**, 1989.

ZHOU, Y.; ZHOU, C.; SENG, Z.; LIU, K.; YANG, F. Characterization of *Citrus tristeza virus* Isolates by Indicators and Molecular Biology Methods. **Agricultural Sciences in China**, p. 573-579, 2007.